

Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia





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)

Laís Henrique Pacheco

Maceió 2012



Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia



Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

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)

Laís Henrique Pacheco

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química. Orientador: Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti Coorientador: Prof^a. Dr^a. Janaína Heberle Bortoluzzi

> Maceió 2012

Catalogação na fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

P116e Pacheco, Laís Henrique. 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) / Laís Henrique Pacheco. – 2012. 79 f. : il., grafs., tabs.
Orientador: Mario Roberto Meneghetti. Co-orientador: Janaína Heberle Bortoluzzi. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2012. Bibliografia: f. 74-79.
1. Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS). 2. Ouro - Nanopartículas. 3. Mamona – Óleo. I. Título.



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) 3214-1384 Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Laís Henrique Pacheco, intitulada: "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)", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 26 de junho de 2012, às 14h, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti Orientador/Presidente – PPGQB/IQB/UFAL

Jonaina & Bortoluzz Profla Dr.ª Janaína Heberle Bortoluzzi Coorientadora - PPGQB/UFAL

Prof.^a Dr.^a Adriana Santos Ribeiro PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez IQ/UnB

À minha família, Cujo seu apoio tornou possível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família pelo amor, incentivo e compreensão sempre que precisei;

Aos meus amigos e colegas de curso e de laboratório que nunca deixaram de acreditar no meu potencial. 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;

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

À Capes, pela bolsa concedida a mim.

E, principalmente, a Deus que nunca deixou de me iluminar e protejer.

RESUMO

Neste trabalho, foram utilizadas nanopartículas de ouro (AuNPs), dispersas em óleo de mamona e imobilizadas em óleo de mamona hidrogenado, para a construção de um possível substrato para Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (substrato SERS-ativo). As AuNPs sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível e por Microscopia Eletrônica de Transmissão, as quais, dependendo do método de síntese, mostraram-se de dois tipos: i) de forma esférica com tamanho médio de 20 nm de AuNPs; e ii) em forma de estrelas, com tamanho médio de 100 nm. Para a investigação da atividade SERS dos substratos obtidos foram utilizadas as moléculas sonda piridina, benzotriazol (BTAH) e Rodamina 6G (R6G). Os espectros SERS foram obtidos através da análise dos substratos após a imersão, por determinado período de tempo, em soluções com diferentes concentrações das moléculas sonda. Os resultados mostraram que o substrato produzido possui sítios com atividade SERS, o que nos permite utilizá-los na análise qualitativa no momento, porém observa-se que análises quantitativas podem também ser realizadas dependendo da concentração de moléculas sonda no meio. Palavras-chave: SERS. Nanopartículas de ouro. Óleo de mamona.

ABSTRACT

In this study, we used gold nanoparticles (AuNPs) dispersed in castor oil and immobilized in hydrogenated castor oil, for the construction of a possible SERSactive substrate. The AuNPs synthesized were characterized by absorption spectroscopy in the Ultraviolet-visible region (UV-vis) and by Transmission Electron Microscopy (TEM), which depending of the synthesis, showed to be of two types :i) of spherical shape whit 20 nm size and ii) star shape with average size of 100 nm. To investigate the SERS activity of the obtained substrates was used the probe molecules of pyridine, benzotriazole (BTAH) and Rhodamine 6G (R6G). The SERS spectra were obtained by analyzing the substrate after the immersion, for a certain period of time, in solutions with different concentrations of probe molecules. The results showed that the produced substrate has sites with SERS activity, allowing us to use them in qualitative or quantitative analysis of molecules in solutions with very small concentrations.

Keywords: SERS. Gold nanoparticles. Castor oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Modelo ilustrativo de um espalhamento Raman	16
Figura 2.2- Espectro Raman de CCl ₄ excitado com laser em λ_0 = 488 nm (Extraído da referência 14)	17
Figura 2.3- Esquema ilustrativo das diferenças entre espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes (Adaptado da referência 18)	19
Figura 2.4- A polarização induzida por um campo elétrico na nuvem eletrônica de uma molécula. A dispersão pode ocorrer em várias direções, porém na figura só foram mostrados 90º e 180º (Adaptado da referência 20).	20
Figura 2.5- Espectros de FT-IR de transmissão (superior) e Raman (inferior) de éster metílico do ácido oleico. (Adaptado da referência 20)	22
Figura 2.6- Diagrama esquemático da instrumentação típica usada 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. Adaptado da referência 28.	27
Figura 2.7- Representação da propagação de plásmons de superfície em (a) uma superfície metálica e (b) localizados em nanoesferas. Adaptada da referência 44.	31
Figura 2.8- Diagrama ilustrativo do mecanismo de intensificação SERS através do modelo químico. Extraído da referência 36	32
Figura 3.1- Imagens do sistema utilizado nas sínteses das nanopartículas de ouro.	36
Figura 3.2- Imagens das etapas de (a) lavagem e (b) secagem dos produtos.	37
Figura 3.3- Imagens das primeiras etapas para a produção dos substratos. (a) Óleo de mamona hidrogenado fundindo; (b) e (c) adição do colóide azul; (d) mistura final	39
Figura 3.4- Etapa final da preparação dos substratos. (a) forma de plástico; (b) forma com a amostra; (c) substrato pronto	39
Figura 3.5- Imagem de um Renishaw inVia Raman Microscope. Extraído de 62.	42

Figura 3.6- Imagem de um espectrômetro com Transformada de Fourier EQUINOX 55 da Bruker Optics. Referência 63	42
Figura 4.1- Espectro de Absorção no Ultravioleta-Visível do colóide vermelho.	44
Figura 4.2- Espectro de Absorção no Ultravioleta-Visível do colóide azul	45
Figura 4.3- Imagens de MET das amostras (a) colóide vermelho - nanoesferas e (b) colóide azul - nanoestrelas	46
Figura 4.4- Espectros FT-Raman dos substratos: pastilhas azul, vermelha e branca.	47
Figura 4.5- 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. Extraído da referencia 60.	48
Figura 4.6- Estrutura molecular da piridina. Obtida da referência 79	50
Figura 4.7- Espectros Raman das pastilhas após imersão em solução de piridina 0,1 mol.L ⁻¹	50
Figura 4.8- Imagem de microscópio da pastilha azul. Parte usada para o mapeamento Raman.	51
Figura 4.9- Análise de mapeamento Raman de área no substrato azul (acima) e espectro registrado na parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo).	53
Figura 4.10- Análise de mapeamento Raman de área no substrato azul (acima) e espectro registrado na parte com coloração menos intensa do mapa (abaixo).	53
Figura 4.11- Análise de mapeamento Raman de área no substrato vermelho (acima), espectro registrado da parte com coloração menos intensa do mapa (centro) e espectro registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo).	54
Figura 4.12- Espectros Raman do substrato (pastilha), em três pontos diferentes, após imersão por 5 minutos em solução com 0,1 mol.L ⁻¹ de piridina.	55
Figura 4.13- Espectros Raman do substrato (pastilha), três pontos diferentes após imersão por 15 minutos em solução com 0,1 mol.L ⁻¹ de piridina	56

Figura 4.14- Espectros Raman do substrato (pastilha), três pontos 56 diferentes, após imersão por 30 minutos em solução com 0,1 mol.L⁻¹ de piridina. -----Figura 4.15- Espectros Raman do substrato (pastilha), três pontos diferentes, após imersão por 1 hora em solução com 0,1 mol.L⁻¹ de piridina. -----57 Figura 4.16- Espectros Raman do substrato (pastilha), três pontos 57 diferentes, após imersão por 2 horas em solução 0,1 mol.L⁻¹ de piridina. ---Figura 4.17- Espectros FT-Raman dos substratos (placas) com nanoestrelas de ouro (azul) após imersão em soluções de piridina com diferentes concentrações, substrato com nanoestrelas sem solução de 59 piridina e substrato sem nanoestrelas (branco) com solução de piridina 10 mol.L⁻¹. -----Figura 4.18- Espectros FT-Raman dos substratos (placas) após imersão 60 em soluções de piridina com diferentes concentrações. -----Figura 4.19- Gráfico da intensidade normalizada referente à banda da 60 piridina em 1014 cm⁻¹ em função da concentração. -----Figura 4.20- Mapeamento de área no substrato (placa) após imersão em solução 10⁻² mol.L⁻¹ de piridina (acima) e espectro Raman registrado da 61 parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo). ------Figura 4.21- Espectros Raman de substratos sem nanopartículas de ouro após imersão em soluções com concentrações de 2,00 mol.L⁻¹, 1,00 62 $mol.L^{-1}$, 0,50 mol. L^{-1} e 0,25 mol. L^{-1} de piridina. Figura 4.22- Espectros Raman de substratos sem nanopartículas de ouro (espectro azul) e com nanopartículas de ouro (espectro vermelho) após 63 imersão em soluções com concentrações de 0,50 mol.L⁻¹ e 0,01 mol.L⁻¹ de piridina, respectivamente. ------Figura 4.23- Estrutura molecular do benzotriazol (BTAH). Extraído da 64 referência 80. -----Figura 4.24- Espectros FT-Raman dos substratos (placas) após imersão em soluções de BTAH com diferentes concentrações, substrato sem 64 BTAH e substrato sem nanoestrelas (branco) com BTAH 10⁻³ mol.L⁻¹. -----Figura 4.25- Espectros FT-Raman dos substratos (placas) após imersão 66 em soluções de benzotriazol com diferentes concentrações. -----Figura 4.26- Gráfico da intensidade normalizada referente à banda do 66 benzotriazol em 790 cm⁻¹ em função de sua concentração. -----

Figura 4.27- Gráfico da intensidade normalizada referente à banda do benzotriazol em 1390 cm ⁻¹ em função de sua concentração	67
Figura 4.28- Análise de mapeamento de área no substrato (placa) após imersão em solução com 10 ⁻² mol.L ⁻¹ de BTAH (acima) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo)	67
Figura 4.29- Estrutura molecular da Rodamina 6G. Extraída da referência 81	68
Figura 4.30- Espectros FT-Raman do substrato (placa) após imersão em solução de R6G com concentração de 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ , substrato sem R6G e substrato sem AuNPs com R6G 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ .	69
Figura 4.31- Análise de mapeamento de área no substrato após imersão em solução com 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ de R6G (acima) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Regiões espectrais e suas transições de origem (adaptada dareferência 6).	15
Tabela 2.2-Comparação entre Espectroscopia Raman e no InfravermelhoMédio.Adaptada da referência 13.	23
Tabela 2.3- Algumas fontes de laser mais utilizadas na espectroscopia Raman ⁵ .	25
Tabela4.1-Atribuição-tentativavibracionalparaoespectrodossubstratos, relacionados à principalmente a estrutura do ácido ricinoléico,de acordo com as referências 70-76.	49
Tabela 4.2-Atribuição-tentativa vibracional para os espectros do BTAHnos substratos, de acordo com a referência 58.	65
Tabela 4.3-Atribuição-tentativa vibracional para os espectros da R6G nossubstratos, de acordo com as referências 82 e 83.	70

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 Motivação 12
1.2 Objetivo geral 13
1.3 Objetivos específicos 13
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS14
2.1 Espectroscopia Raman
2.1.1 Breve histórico 14
2.1.2 Teoria da espectroscopia Raman1
2.1.2.1 A origem do espectro Raman 15
2.1.2.2 Modelo ondulatório para os espalhamentos Raman e Rayleigh 19
2.1.3 Raman versus Infravermelho 22
2.1.4 Instrumentação 23
2.1.5 Aplicações 27
2.2 Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície 29
2.2.1 Modelo Eletromagnético 29
2.2.2 Modelo Molecular 3'
2.2.3 Substratos SERS-ativos 32
3 PARTE EXPERIMENTAL
3.1 Síntese de nanopartículas de ouro 38
3.2 Técnicas de Caracterização das Nanopartículas de Ouro 37
3.2.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível 37
3.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão 33
3.3 Preparação dos substratos SERS-ativos 38
3.4 Testes dos substratos 40
3.4.1 Utilizando piridina como molécula sonda 40
3.4.2 l'empo de imersão 40
3.4.3 Limite de detecção da piridina 4(
3.4.4 Variação na concentração de piridina em substratos sem 4'
A A A Litilizanda Banzatriazal (PTAH) some malégula condo
3.4.5 Utilizando Benzothazoi (BTAR) como molécula sonda
3.5 Análisos do espectroscopia Paman
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
4.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro 43
4.2 Técnicas de Caracterização das Nanopartículas de Ouro 43
4.2.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível 44
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão 4
4.3 Preparação dos Substratos 40
4.4 leste dos Substratos 4
4.4.1 Utilizando piridina como molecula sonda 49
4.4.2 i empo de imersao54
4.4.3 LIMITE de detecção da piridina 58
4.4.4 vanação na concentração de pindina em substratos sem 62
nanoparticulas de outo

SUMÁRIO

4.4.5 Utilizando Benzotriazol (BTAH) como molécula sonda 4.4.6 Utilizando Rodamina 6G (R6G) como molécula sonda	64 68
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6 PERSPECTIVAS	73
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

Materiais nanoestruturados têm sido bastante estudados devido às suas propriedades ópticas e magnéticas diferenciadas. Uma de suas aplicações é na Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*), que utiliza superfícies metálicas rugosas nanoestruturadas para intensificação de sinais Raman de moléculas adsorvidas à sua superfície em concentrações muito baixas. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para a fabricação deste tipo de material com atividade SERS, que são chamados de substrato SERS-ativo. O principal desafio é a obtenção de substratos com superfícies com estruturas ordenadas (periódicas), que sejam altamente reprodutíveis e estáveis.

A técnica de espectroscopia Raman pode ser utilizada no estudo de propriedades vibracionais de moléculas, fornecendo informações estruturais, conformacionais, e até mesmo sobre sua reatividade. Porém, por apresentar uma baixa seção de choque, devido ao pequeno número de fótons espalhados, torna-se uma técnica pouco eficiente, se comparada à espectroscopia no Infravermelho ou à Fluorescência. Esta limitação foi superada a partir da descoberta do efeito denominado Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS), por Fleishmann e colaboradores,^{1,2,3} após a observação da intensificação dos sinais Raman da piridina, adsorvida em eletrodos de prata modificados, com excelente relação sinal/ruído.

Desde então, o efeito SERS vem sendo estudado tanto na detecção de novas moléculas quanto no desenvolvimento de outros substratos SERS-ativos contendo outros metais, como ouro e cobre¹. No entanto, um dos principais desafios nas análises utilizando o efeito SERS está no desenvolvimento de substratos SERS-ativos que simultaneamente promovam um consistente, repetitivo e alto fator de intensificação Raman⁴.

Na busca para enfrentar este desafio, vários pesquisadores desenvolveram técnicas de fabricação para a obtenção de substratos com essas características, como utilização de nanopartículas revestidas, nanocascas metálicas, nanoanéis,

nanoarames, entre outras nanoestruturas geralmente metálicas com a superfície ligeiramente rugosa^{2,4}.

Então, o principal desafio deste trabalho foi desenvolver um material nanoestruturado com a possibilidade de produção de um substrato SERS-ativo que superasse as limitações citadas anteriormente, além de ser de fácil preparação.

1.2 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo da atividade SERS de um substrato produzido a partir de nanopartículas de ouro imobilizadas em uma matriz orgânica a base de óleo de mamona hidrogenado.

1.3 Objetivos específicos

- Síntese de nanopartículas de ouro de forma controlada com aspecto ligeiramente rugoso;
- Estabilização das partículas preparadas em uma matriz orgânica sólida a temperatura ambiente e não tóxica;
- Caracterização do material obtido através das técnicas de Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível e Microscopia Eletrônica de Transmissão;
- Testar sua atividade em relação à molécula sonda de piridina, assim como o tempo de adsorção da piridina à superfície do substrato;
- Estudar o comportamento do substrato em diferentes concentrações de piridina e determinar o seu limite de detecção.
- Avaliar sua atividade em relação à molécula sonda do benzotriazol em diferentes concentrações.
- Estudar a atividade do substrato referente à molécula sonda de Rodamina 6G.
- Avaliar o potencial de uso do substrato SERS-ativo desenvolvido.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Espectroscopia Raman

2.1.1 Breve histórico

O avanço no 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 ganhou o Prêmio Nobel de Física em 1931 por este trabalho⁵⁻⁷.

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 Maiman⁸. Em 1963, Kogelnik e Porto obtiveram os primeiros espectros Raman utilizando *lasers*⁹. Ocorreram progressos também nos sistemas de detecção, considerando que inicialmente, até a Segunda Guerra Mundial, as medidas eram feitas utilizando placas fotográficas, sendo que posteriormente a detecção fotoelétrica passou a ser utilizada nesta técnica^{6, 10}.

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, aqueles que empregam vários detectores, monitorando simultaneamente vários comprimentos de onda, como os sensores CCD, Dispositivo de Carga Acoplada (*Charge Coupled Device*)^{6,10, 11}.

Estas transformações na área instrumental para medidas espectroscópicas Raman foram conduzidas até os dias atuais, porém, hoje também podem ser obtidos espectros Raman por transformada de Fourier (FT-Raman), instrumentos que podem estar acoplados a Espectrômetros de Infravermelho (FT-IR), abrindo novas possibilidades no estudo do efeito Raman^{6, 10}.

2.1.2 Teoria da espectroscopia Raman

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, o que proporciona transições eletrônicas nos níveis de energia de átomos e moléculas. Dependendo dos tipos de níveis energéticos envolvidos (eletrônicos, vibracionais ou rotacionais), as transições podem ocorrer na região do ultravioletavisível, do infravermelho/Raman ou na região de micro-ondas¹⁰.

A Tabela 2.1 mostra alguns tipos de espectroscopia, suas regiões espectrais e suas transições eletrônicas de origem.

	1	
Espectroscopia	Região (ῦ, cm⁻')	Origem
Raio-y	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

Tabela 2.1- Regiões espectrais e suas transições de origem.

Fonte: Adaptada da referência 6.

2.1.2.1 A origem do espectro Raman

Os espectros Raman são obtidos a partir da irradiação da 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.

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^{5, 13}.

A Figura 2.1 mostra um modelo ilustrativo da interação da radiação de excitação com frequência v_o , e seus espalhamentos resultantes: Stokes, Rayleigh e anti-Stokes, com frequências $v_o - v_m$, v_o , $v_o + v_m$, respectivamente. Onde v_m representa uma das frequências vibracionais da amostra.



Figura 2.1- Modelo ilustrativo de um espalhamento Raman

Fonte: autora da dissertação, 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 espectro⁶. 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^{6, 10}. Este comportamento está demonstrado na Figura 2.2, com o espectro do tetracloreto de carbono, CCl₄.

Como a fluorescência pode interferir seriamente na região Stokes do espectro, os sinais anti-Stokes, mesmo com menores intensidades, podem ser mais úteis nesses casos⁵.





Fonte: Extraído da referência 14.

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 maior de 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^{10, 15}.

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^{10, 15}. 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 ambiente¹⁶, faz com que o espalhamento Raman anti-Stokes seja mais fraco que os 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 estado⁵.

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, consequentemente, deslocamentos dos comprimentos de onda¹⁷.

A Figura 2.3 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.

Além disso, a radiação pode interagir com a matéria de outras maneiras, dando início a uma série de excitações elementares, como: os poláritons, as ondas de spin, os plásmons, 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 fônons¹⁹. Esses tipos de interação não serão discutidos neste trabalho.

Figura 2.3- Esquema ilustrativo das diferenças entre espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes.



Fonte: Adaptado da referência 18.

2.1.2.2 Modelo ondulatório para os espalhamentos Raman e Rayleigh

O Efeito Raman pode também ser compreendido através do modelo ondulatório, que será discutido nesta seção.

A descrição clássica do efeito Raman, mostrado na Figura 2.4, está ligada à variação do momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico oscilante da radiação incidente²⁰.

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 ¹⁹:

$$P = \alpha E \tag{1}$$

Onde α mede a facilidade que a nuvem eletrônica tem para se deformar e originar o dipolo¹⁹.

O tratamento da mecânica clássica e da mecânica quântica para o espalhamento Raman é baseado na equação (1)²⁰.

Figura 2.4- 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 da referência 20.

De acordo com a teoria clássica, a intensidade do campo elétrico (E) produzido pelo *laser* oscila com o tempo, como é mostrado na equação (2)⁶:

$$E = E_0 \cos 2\pi v_0 t \tag{2}$$

Onde E_0 é a amplitude da vibração e v_o é a frequência do *laser*. Se uma molécula diatômica é irradiada por essa luz, e um momento de dipolo elétrico (*P*) é induzido, então⁶:

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi v_0 t \tag{3}$$

Se uma molécula está vibrando com frequência v_m , o deslocamento nuclear (*q*) será escrito como⁶:

$$q = q_0 \cos 2\pi v_m t \tag{4}$$

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^{10, 19}:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \cdots$$
 (5)

Onde os termos de ordem mais alta são desprezados devido à pequena variação da coordenada q^{10} , 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 equilíbrio⁶.

Combinando as equações (3), (4) e (5), temos:

$$P = \alpha_0 \ E_0 \cos(2\pi v_o t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 \ q_0 \ E_0 \cos(2\pi v_o t) \cos(2\pi v_m t) \tag{6}$$

Fazendo as manipulações trigonométricas necessárias na equação (6), teremos:

$$P = \alpha_0 \ E_0 \cos(2\pi v_o t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 \ q_0 \ E_0 \left\{\cos[2\pi (v_o + v_m)t] + \cos[2\pi (v_o - v_m)t]\right\}$$
(7)

Pode ser observado na equação (7) que o primeiro termo dá origem ao espalhamento elástico da luz (Rayleigh), já que este só depende da frequência v_o . 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^{19} . Ou seja:

$$\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 \neq 0 \tag{8}$$

Outra observação que pode ser feita na equação (7) é que as frequências $(v_o - v_m)$ e $(v_o + v_m)$ estão diretamente relacionadas às frequências dos espalhamentos Raman Stokes e Anti-Stokes, respectivamente¹⁹.

2.1.3 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 ambos¹⁷.

Apesar da grande semelhança entre os espectros de Infravermelho e Raman, ambos originados dos modos vibracionais das moléculas^{5, 21}, eles são obtidos através de fenômenos fisicamente diferentes^{10, 14}. 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 fundamental¹⁴.

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^{5, 22}.

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^{20, 22}.

Mostramos um exemplo na Figura 2.5, onde temos espectros de Infravermelho (superior) e Raman (inferior) do ácido oleico.

Figura 2.5- Espectros de FT-IR de transmissão (superior) e Raman (inferior) do éster metílico do ácido oleico.



Fonte: Adaptado da referência 20.

Podemos observar diferenças nas intensidades de duas bandas, referentes ao estiramento das ligações C=C e C=O, como indicadas na Figura 2.5. 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^{20, 22}.

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 2.2 mostra algumas comparações entre as técnicas de espectroscopia Raman e FT-IR médio.

	Espectroscopia Raman	Infravermelho (Médio)
Fenômeno	Espalhamento	Absorção
Informação	Bandas de vibrações fundamentais (região de impressão digital).	Bandas de vibrações fundamentais (região de impressão digital)
	Sem problemas com baixos números de onda.	
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, em pó, pastilha, 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.

Tabela 2.2- Comparação entre Espectroscopia Raman e no Infravermelho Médio.

Fonte: Adaptada da referência 13.

2.1.4 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)¹⁸.

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 intenso²³⁻²⁵.

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, consequentemente, a sensibilidade da técnica também será otimizada²⁶.

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)¹⁸.

Os primeiros *lasers* comerciais começaram a aparecer na década de 70. Na mesma época, o brasileiro Sergio Porto⁹ 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^{26, 27}.

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

A utilização de excitação com *lasers* no infravermelho próximo e técnicas de transformada de Fourier (espectroscopia FT-Raman) virtualmente eliminam a limitação encontrada com amostras fluorescentes²⁷.

Os cinco *lasers* mais comuns utilizados na espectroscopia Raman estão listados na Tabela 2.3:

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
Laser de diodo	782 ou 830
Nd:YAG [*]	1.064

Tabela 2.3- Algumas fontes *lasers* mais utilizadas na espectroscopia Raman.

* neodymium-doped yttrium aluminum garnet; Nd:Y₃Al₅O₁₂

Fonte: Extraída da referência 5.

• 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, com uma distância maior do que 100 metros entre a fonte e a amostra⁵.

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 Raman¹⁸.

O acoplamento de um microscópio ao espectrômetro Raman, pode ser chamado de microscopia Raman, fornecendo-nos 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^{26, 28}.

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*^{18, 20}.

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 20}.

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)²².

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 3-5 cm⁻¹ podem ser eficientemente detectados¹⁸.

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 analítica¹⁸.

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)^{11, 18}.

Uma das vantagens obtidas utilizando-se instrumentos multicanais está relacionada diretamente ao tempo de análise e à relação sinal/ruído¹¹.

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 Raman¹⁸.

A Figura 2.6 mostra uma apresentação esquemática de dois instrumentos utilizados na espectroscopia Raman. A primeira configuração (Figura 2.6a) 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.

Para os experimentos que requerem maior resolução espacial, como já mencionado, a configuração de um micro-Raman é utilizada (Figura 2.6b). 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.

Figura 2.6- 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 da referência 28.

2.1.5 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 pesquisa³⁰.

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 coordenação⁵.

Uma grande aplicação da espectroscopia Raman é no estudo de materiais metálicos nanoestruturados, onde se observa um fenômeno chamado efeito SERS, tema principal do nosso trabalho, que será discutido na próxima seção.

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 amostras³¹. 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^{6, 32}, e em áreas como, por exemplo: ciências dos materiais, ciências forenses, indústria farmacêutica, mineralogia, nanotecnologia, entre outras³³.

Outras aplicações para espectroscopia Raman são encontradas devido ao desenvolvimento de novos métodos de análise, como 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. Com isso, ocorre a intensificação de determinadas bandas Raman que pode chegar a 5 ordens de grandeza^{2, 34}.

2.2 Espectroscopia Raman intensificada por superfície

O efeito Raman intensificado por superfície foi observado pela primeira vez em 1974 por Fleischmann e colaboradores³, quando estes tentavam estudar reações eletroquímicas de piridina adsorvida em superfície de um eletrodo de prata através da espectroscopia Raman, porém o seu efeito de intensificação só foi considerado alguns anos depois³⁵. No Brasil, esse efeito foi inicialmente estudado por Oswaldo Sala.

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^{22, 36, 38-40}.

Em um espectro SERS, as linhas Raman das moléculas adsorvidas são frequentemente intensificadas por um fator de 10³ a 10⁶, podendo chegar a um limite de detecção de 10⁻⁹ a 10⁻¹² quando aliada à técnica de Raman Ressonante. Por isso passou a ser chamada SERRS (*Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*), podendo detectar até uma única molécula^{5, 36}. 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 diluídas⁴¹.

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 fenômeno³⁶.

De acordo com Sala¹⁰, há dois modelos fundamentais que buscam elucidar o mecanismo responsável pelo efeito SERS: o eletromagnético e o molecular.

2.2.1 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 modelo²². 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^{42, 43}.

A SPR permite a geração de campos coulombianos de longo alcance²². Isso explicaria as intensificações a longas distâncias e o espectro obtido deve ser similar ao obtido da molécula em solução, uma vez que o campo elétrico depende da distância entre a molécula e a superfície (1/r¹²), e não depende, assim, do contato entre elas. Portanto, de acordo com este mecanismo, a molécula adsorvida não seria afetada³⁶.

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 visível⁴⁴.

A Figura 2.7(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, como em uma nanopartícula de metal, o plásmon correspondente é chamado de plásmon de superfície localizados⁴⁴.

A Figura 2.7(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. 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 elétrico⁴⁴. Esse efeito pode ser chamado de ressonância do plásmon de superfície localizado (*localized surface plásmon resonance*, LSPR)²⁸, como já mencionado.

Figura 2.7- Representação da propagação de plásmons de superfície em (a) uma superfície metálica e (b) localizados em nanoesferas.



Fonte: Adaptada da referência 44.

Como a intensidade da radiação espalhada é proporcional ao quadrado do momento de dipolo induzido, a intensificação do campo eletromagnético causa um aumento da intensidade Raman¹⁰.

2.2.2 Modelo Molecular

O modelo molecular, conhecido também como modelo químico, 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, o espectro obtido pode ser diferente do mesmo 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)¹⁰.

O modelo supõe que um elétron do nível de Fermi do metal é excitado por um fóton incidente, criando um par elétron-buraco. Onde o elétron é transferido por efeito túnel, ou seja, atravessa uma região em que a energia potencial é maior que a sua energia total⁴⁵, 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 2.8^{36, 46, 47}.

Figura 2.8- Diagrama ilustrativo do mecanismo de intensificação SERS através do modelo químico.



Fonte: Extraído da referência 36.

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^{10, 47}.

Dos dois processos, geralmente o mecanismo eletromagnético (EM) fornece maior contribuição para a intensificação dos sinais Raman e é de acordo com este modelo que são produzidos e/ou modificados os substratos SERS-ativos^{16, 47, 48}. Porém, atualmente, ainda não existe um consenso na literatura sobre as contribuições relativas de cada um dos mecanismos^{36, 37}.

2.2.3 Substratos SERS-ativos

Desde que os modelos teóricos para o SERS começaram a ser propostos, muitos tipos de substratos foram testados. Porém, os mais empregados são os coloides, os eletrodos e filmes depositados à vácuo, que são de fácil preparação^{34,36}.
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 em uma matriz orgânica sólida de óleo de mamona hidrogenado, que será melhor discutido no capítulo 3.

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^{10, 16, 49}.

A partir disso, vários grupos começaram a desenvolver materiais com superfícies metálicas rugosas ou utilizando agregados com partículas de ouro ou prata. Apesar destes dois tipos de substratos mostrarem boa atividade, possuem baixas reprodutibilidades em certas posições, chamadas "*hot spot*", onde o campo elétrico de mais significativa contribuição está localizado. Isso é consequência de variações na rugosidade da superfície e no tamanho das partículas coloidais, o que dificulta sua utilização para análises quantitativas^{16, 37}.

Recentemente estão sendo desenvolvidos vários esquemas diferentes para a produção de um LSPR altamente uniforme e nanoestruturas reprodutíveis a partir de diversos materiais. Como estão sendo reportados na literatura, substratos SERS gerados a partir da imobilização de nanopartículas 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 aminopropyltrimethoxisilano, mantendo a integridade, o desempenho e a estabilidade do substrato SERS ativo ao longo do tempo³⁵.

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 funcionalizadas¹⁶, como reportado por Khoury e colaboradores⁵⁰.

Diversos substratos SERS ativos a partir de nanopartículas de ouro já foram produzidos, Minghua Wang e colaboradores⁵¹ 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 estável substrato SERS ativo, promovendo forte e consistente intensificação SERS.

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. Portanto, este foi o foco do nosso trabalho.

3 PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho teve início com a síntese de nanopartículas de ouro utilizando citrato trissódico como agente redutor e óleo de mamona como meio dispersante e estabilizante. Em seguida, as amostras obtidas foram caracterizadas utilizando as técnicas de absorção 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 possível substrato SERS-ativo. O substrato foi testado utilizando piridina^{3, 51, 52,}, Rodamina 6G⁵³⁻⁵⁵ e benzotriazol⁵⁶⁻⁵⁸ como moléculas sonda.

3.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro

Foram preparados dois tipos de nanopartículas de ouro seguindo os procedimentos de Morais e colaboradores⁵⁹ que reportaram um método de síntese adaptado de da Silva⁶⁰. O método consiste na redução do Au(III) a Au(0), na presença de óleo de mamona.

A fonte de ouro utilizada foi o ácido tetracloroáurico(III) tri-hidratado (ACROS ORGANICS), onde preparou-se uma solução de 25,0 mM pela adição de 1,0 g do ácido 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.

Para obtenção das nanopartículas de ouro com formas diferentes foram realizadas duas sínteses em sistemas reacionais idênticos, variando apenas a quantidade de reagentes. As sínteses consistiram na adição inicial de 10 mL de óleo de mamona (SIGMA-ALDRICH) e 10 mL de etanol (DINÂMICA) a um sistema reacional, mostrado na Figura 3.1. Este sistema consiste em 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 3.1- Imagens do sistema utilizado nas sínteses das nanopartículas de ouro.

Fonte: autora da dissertação, 2012.

Em seguida, em uma das sínteses foram adicionados 1,0 mL da solução de ácido tetracloroáurico(III) e 5,0 mL da solução de citrato, preparadas anteriormente. Na segunda síntese foram adicionados 2,0 mL da solução de ácido tetracloroáurico(III) e 2,5 mL da solução de citrato. E então, elevou-se a temperatura dos sistemas reacionais para 80 °C, deixando-os com agitação e temperatura constante por 24 horas.

Logo após, os produtos das reações foram lavados com água destilada,e transferidos para frascos de Schlenck, onde foram submetidos à secagem a alto vácuo por aproximadamente 7 horas (Figura 3.2). Finalmente, foram obtidos dois coloides com colorações diferentes, um vermelho (primeira síntese) e um azul (segunda síntese).

Figura 3.2- Imagens das etapas de (a) lavagem e (b) secagem do produto da segunda síntese.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

3.2 Técnicas de Caracterização das Nanopartículas de Ouro

Os dois coloides obtidos foram caracterizados por Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível (UV-vis) e por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), como será descrito nas próximas seções.

3.2.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)

Nas caracterizações feitas por UV-vis, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro modelo VARIAN Cary 50, o qual foi configurado para a correção da linha de base do óleo de mamona e foi utilizada uma faixa de absorção de 400 nm a 800 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 mm.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As caracterizações feitas por MET foram realizadas no Centro de Tecnologia do Nordeste (CETENE), localizado em Recife/PE, onde dois Microscópios Eletrônicos de Transmissão FEI foram utilizados. O primeiro foi o 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. O segundo foi um modelo Morgagni 268D, de 100 kV, com câmera CCD e resolução de ponto de 0,45 nm, resolução de linha de 0,34 nm e magnificação de até 180.000 vezes.

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

3.3 Preparação dos Substratos SERS-Ativos

Os substratos foram preparados para teste de atividade SERS, onde se imobilizou os coloides obtidos 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 vermelho, do coloide azul ou apenas do óleo de mamona puro, mantendo o sistema a temperatura constante até que a mistura se tornasse homogênea, como ilustrado na Figura 3.3.

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 minutos 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 3.4.

Cada substrato contendo nanopartículas apresentou a cor de seu coloide de origem, ou seja, foram produzidos substratos nas cores azul, vermelha e branca, este último sem nanopartículas.

Em alguns testes que serão descritos na próxima seção, os substratos (pastilhas) foram fundidos e solidificados novamente, mas agora, foram utilizados apenas 40 µL do substrato fundido e gotejados em placas de vidro para solidificação, para um melhor aproveitamento dos substratos, uma vez que são necessárias pequenas quantidades de amostras.

Figura 3.3- Imagens das primeiras etapas na produção dos substratos. (a) Óleo de mamona hidrogenado fundindo; (b) e (c) adição do coloide azul; (d) mistura final.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Figura 3.4- Etapa final da preparação dos substratos. (a) forma de plástico; (b) forma com a amostra; (c) substrato pronto.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

3.4 Teste dos Substratos

Inicialmente foram feitas as análises de Espectroscopia Raman dos três substratos (Pastilhas: vermelha, azul e branca) para a obtenção de seus espectros para futuras comparações.

A atividade dos substratos foi testada com piridina, Rodamina 6G e benzotriazol como moléculas sonda.

3.4.1 Utilizando piridina como molécula sonda

O primeiro teste realizado foi com a piridina, onde uma solução com 0,1 mol. L⁻¹ de piridina (REAGEN), em hexano (DINÂMICA) foi preparada. Cada substrato (Pastilhas: azul, vermelha e branca) foi mergulhado em 30 mL de solução onde permaneceu por 1 hora. Passado esse tempo, os substratos foram retirados da solução, deixados à temperatura ambiente, na capela, para secagem do solvente, e após aproximadamente 20 minutos foram realizadas as análises, que foram repetidas, no mínimo por seis vezes, em locais diferentes dos substratos.

3.4.2 Tempo de imersão

Com uma solução de piridina 0,1 mol.L⁻¹ em hexano, foi testada a influência do tempo de imersão na solução com a intensificação dos sinais da piridina. Cada substrato (pastilhas) foi imerso em aproximadamente 30 mL de solução, contudo, variou-se o tempo de imersão dos substratos (5, 15, 30, 60 e 120 min). Em todos os tempos, as análises foram feitas em triplicata e em pontos diferentes da amostra para observar a reprodutibilidade dos resultados.

3.4.3 Limite de detecção da piridina

A fim de estudar o limite de detecção da piridina com este substrato, foram feitas soluções com diferentes concentrações de piridina em etanol. Os mesmos procedimentos dos testes 3.4.1 e 3.4.2 foram repetidos, porém, foram utilizados os substratos produzidos nas placas de vidro e para garantir a adsorção das moléculas sobre a superfície do substrato, estes permaneceram imersos nas soluções por 24 horas. As soluções preparadas tiveram concentrações de 10⁻² mol.L⁻¹, 10⁻³ mol.L⁻¹, 10⁻⁴ mol.L⁻¹ e 10⁻⁵ mol.L⁻¹.

3.4.4 Variação na concentração de piridina em substratos sem nanopartículas de ouro

Para observar qual o fator de intensificação das bandas da piridina promovido pelo substrato SERS-ativo, foram realizados testes com pastilhas sem nanopartículas de ouro. Assim, soluções de piridina nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 mol.L⁻¹ foram preparadas e repetidos os procedimentos com imersão por 1 hora.

3.4.5 Utilizando Benzotriazol (BTAH) como molécula sonda

Para testar a eficiência do substrato em relação à molécula sonda benzotriazol, foram preparadas soluções com concentrações de 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴; e 10⁻⁵ mol.L⁻¹ de benzotriazol em etanol e seguidos os mesmo procedimentos que o teste 3.4.3.

3.4.6 Utilizando Rodamina 6G (R6G) como molécula sonda

O substrato também foi testado com a molécula sonda Rodamina 6G. Para isto, utilizou-se uma solução de 10⁻³ mol.L⁻¹ de R6G em etanol. Os procedimentos foram os mesmos que os seguidos no teste com piridina em 3.4.1.

3.5 Análises de Espectroscopia Raman

Neste trabalho foram utilizados dois espectrômetros Raman para as análises.

O primeiro espectrômetro Raman, pertence ao Grupo de Catálise e Reatividade Química da Universidade Federal de Alagoas, Renishaw inVia Raman Microscope, mostrado na Figura 3.5. 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 nossa amostra 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 com tempo de exposição de 10 segundos e 5 acumulações ou método de mapeamento com exposição de 1 segundo e 1 acumulação, com números de espectros variando entre 60 e 1300.

O segundo equipamento utilizado está localizado no Laboratório de Materiais e Combustíveis da Universidade de Brasília, um espectrômetro com Transformada de Fourier EQUINOX 55 da Bruker Optics (Figura 3.6). Este espectrômetro possui um acessório para FT-Raman que usa um detector de germânio, o qual é resfrigerado 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.

Figura 3.5- Imagem de um Renishaw inVia Raman Microscope.



Fonte: Extraído da referência 62.

Figura 3.6- Imagem de um espectrômetro com Transformada de Fourier EQUINOX 55 da Bruker Optics.



Fonte: Extraído da referência: 63.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que o objetivo principal do nosso trabalho foi o estudo e desenvolvimento de um novo substrato SERS-ativo a partir de nanopartículas de ouro, estas obtidas por uma rota sintética já desenvolvida e caracterizada anteriormente pelo grupo, não discutiremos de forma detalhada a síntese. Para maiores informações, ver referências 59, 60 e 64.

A síntese utilizada deu origem a nanopartículas de ouro em uma matriz orgânica, não tóxica e biocompatível, o que pode levar a aplicações bastante interessantes desse material, principalmente para área biológica, mas também para aplicação em detecção que é o foco deste trabalho.

4.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

Uma vez que as propriedades ópticas dos materiais nanoestruturados dependem de sua forma e tamanho, utilizamos nanopartículas com formas diferentes para a construção dos substratos e comparação dos resultados.

Como descrito no capítulo anterior, através do método utilizado, foi possível a obtenção de dois coloides, um de coloração azul e outro de coloração vermelha, o que caracteriza a obtenção de coloides de nanopartículas com formas e/ou tamanhos diferentes, já que as cores dos coloides são características de seus respectivos plásmons de superfície em ressonância com as frequências da luz incidente⁶⁵. Isso pôde ser confirmado através das técnicas de caracterização.

4.2 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. Outra técnica essencial para a caracterização de nanomateriais é a Microscopia Eletrônica de Transmissão, a qual possibilita a obtenção de imagens diretas das nanopartículas, assim como a distribuição de seus tamanhos⁶⁶.

Estas técnicas foram utilizadas para a caracterização dos coloides obtidos e seus resultados estarão discutidos nas próximas seções.

4.2.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)

Para a caracterização das nanopartículas de ouro a partir dos coloides obtidos (vermelho e azul) foram registrados os espectros de absorção na região do Ultravioleta-visível dos dois coloides utilizando como linha de base o espectro do óleo de mamona puro, este transparente na região do espectro eletromagnético⁶⁴ entre comprimentos de onda de 200 nm a 800 nm. Os espectros de absorção dos coloides estão mostrados nas Figuras 4.1 e 4.2, a seguir.





Fonte: autora da dissertação, 2012.

O espectro de absorção do coloide vermelho (Figura 4.1) mostra uma banda de absorção máxima em aproximadamente 530 nm, referente à absorção do plásmon das nanopartículas, o que caracteriza nanopartículas de ouro com diâmetro de aproximadamente 20 nm, de acordo com Morais e Haiss^{59, 67}.

O espectro de absorção do coloide azul (Figura 4.2) mostra uma banda mais alargada e com absorção máxima em aproximadamente 590 nm, o que caracteriza nanopartículas de ouro com aproximadamente 100 nm^{59, 67}.





Fonte: autora da dissertação, 2012.

Os tamanhos e formas diferentes das nanopartículas obtidas foram comprovados através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão, discutida na próxima seção.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a confirmação das formas e dos tamanhos das nanopartículas presentes nos coloides obtidos, foram realizadas as suas análises pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão e suas imagens resultantes estão mostradas na Figura 4.3.

Figura 4.3- Imagens de MET das amostras (a) coloide vermelho - nanoesferas e (b) coloide azul - nanoestrelas.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

A Figura 4.3(a) mostra uma imagem típica das nanopartículas obtidas através da análise de MET do coloide vermelho, onde podemos observar que as nanopartículas de ouro obtidas tiveram o formato esférico com tamanho médio de 20 nm.

A Figura 4.3(b), mostra a imagem de MET do coloide azul, onde pode-se observar o formato irregular das nanopartículas de ouro formadas, com algumas pontas e tamanho médio de 100 nm, a esse tipo de nanopartícula dá-se o nome de nanoestrelas. De acordo com Feng Hao e colaboradores⁴³, 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.

4.3 Preparação dos Substratos

Uma vez caracterizados os coloides obtidos, seus respectivos substratos puderam ser construídos: um vermelho, originado do coloide vermelho; e um azul, originado do coloide azul. Também foi construído um substrato sem os coloides, gerando uma pastilha branca.

Os substratos foram obtidos pela imobilização, em óleo de mamona hidrogenado, dos coloides de nanopartículas de ouro dispersos em óleo de

mamona. A mistura final é um sólido com consistência de uma cera. Lembrando-se que o material antes de solidificar é colocado em moldes que levam a formação de pastilhas ou é depositado sobre placas de vidro, levando a formação de um filme. Cada uma dessas formas de substratos SERS foi testada e seus resultados serão discutidos nas próximas seções.

4.4 Teste dos Substratos

Os três tipos de substratos (pastilhas) foram analisados por Espectroscopia FT-Raman e seus espectros estão mostrados na Figura 4.4. 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 nos substratos vermelho e azul, porém com maior intensidade no substrato azul, o que é de se esperar, já que este possui nanoestrelas que, de acordo com Hao e colaboradores⁴³, demonstram plásmon de superfície com maior poder de intensificação nas pontas do que em nanoesferas, presentes no substrato vermelho.



Figura 4.4- Espectros FT-Raman dos substratos: pastilhas azul, vermelha e branca.

Fonte: autora da dissertação, 2012.

A presença da banda referente ao plásmon de superfície indica que o substrato pode apresentar atividade SERS, no caso, apenas os substratos azul e vermelho. 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.

Uma vez que o óleo de mamona é composto principalmente pelo ácido ricinoleico (Figura 4.5), cerca de 90% ^{68, 69}, pode-se tentar uma atribuição vibracional para as bandas observadas nos espectros a partir da estrutura desse ácido e de acordo com dados da literatura⁷⁰⁻⁷⁶. As descrições e atribuições-tentativa para cada banda mostrada nos espectros da Figura 4.4 estão relacionadas na Tabela 4.1, assim como suas intensidades relativas.

Figura 4.5- 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 da referência 60.

Número de onda (cm ⁻¹)	Intensidade relativa [*]	Atribuição-tentativa ^{**}
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 cis
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

Tabela 4.1- Atribuição-tentativa vibracional para os espectros dos substratos, relacionados principalmente à estrutura do ácido ricinoleico, de acordo com as referências 70-76.

* 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.

Fonte: autora da dissertação, 2012.

4.4.1 Utilizando piridina como molécula sonda

A atividade SERS do nosso substrato foi testada primeiramente em relação à molécula de piridina (Figura 4.6), a fim de se obter uma intensificação de suas bandas de dispersão Raman em aproximadamente 1012 cm⁻¹ e 1036 cm^{-1 77, 78}, que são atribuídas aos modos de respiração e deformação simétrica do anel, respectivamente⁷³.

Figura 4.6- Estrutura molecular da piridina.



Fonte: Extraída da referência 79.

Os espectros Raman obtidos estão mostrados na Figura 4.7, 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 azul ocorre a presença destas bandas, indicando uma intensificação das mesmas, pois se compararmos com o substrato padrão (branco), nesta concentração, não apresentou nenhum sinal de piridina, assim como o substrato vermelho. Este fato era esperado, uma vez que o substrato azul demonstrou a banda referente ao plásmon de superfície bastante intensa em relação aos outros. Porém, como o substrato vermelho também exibiu esta banda, em menor intensidade, deveria ou poderia também apresentar a intensificação das bandas da piridina.

Figura 4.7- Espectros Raman obtidos das pastilhas após imersão em solução de piridina 0,1 mol.L⁻¹.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Apesar da existência da banda referente ao plásmon de superfície, a atividade SERS no substrato vermelho não pode ser comprovada, pois foram feitas análises em vários pontos da amostra e todos os espectros foram idênticos, sem presença das bandas referentes à piridina.

Como não tínhamos o controle de como as nanopartículas estariam dispersas no substrato, também não tínhamos como controlar a formação dos "hot spots", onde há a maior intensificação do campo elétrico. Assim, com o intuito de estudar a formação desses sítios SERS-ativos, foram feitas análises Raman em vários pontos de determinada área das amostras, utilizando o método de mapeamento que pode ser obtido com o equipamento Renishaw inVia Raman Microscope.

A Figura 4.8 mostra uma área do substrato azul, vista do próprio microscópio acoplado ao espectrômetro Raman, onde foram escolhidos os pontos a serem analisados a procura dos "hot spots".

Figura 4.8- Imagem de microscópio da pastilha azul, parte usada para o mapeamento Raman.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

A imagem foi capturada utilizando-se a objetiva de aumento de 50x do microscópio acoplado ao espectrômetro, a mesma usada na obtenção de todas as análises pelo método de mapeamento.

A imagem nos mostra que nossa amostra não é totalmente homogênea, possui algumas partes com deformações imperceptíveis sem a ajuda do microscópio. Estas deformações são prováveis sítios SERS-ativos ou "hot spot", pois onde pode haver uma maior concentração de nanopartículas na superfície da pastilha, provocando a intensificação do campo elétrico local, provocando maior intensificação nos sinais Raman^{28, 78}.

A área escolhida para as análises está demonstrada nas Figuras 4.9 e 4.10, onde foram registrados 1300 espectros, representados por cada um dos retângulos em diferentes tons de vermelho. A análise do mapa foi feita escolhendo-se a banda referente ao plásmon de superfície, ou seja, em aproximadamente 257 cm⁻¹. Assim, onde a coloração, na escala do vermelho, estiver mais intensa, indica uma maior intensidade desta banda, como pode ser observado na Figura 4.9, a qual mostra o espectro onde a coloração foi mais intensa. O contrário é observado na Figura 4.10, onde está mostrado um espectro do local do mapa onde a coloração foi menos intensa.

Estas análises mostraram mais uma vez a não uniformidade do substrato obtido, como pôde ser visto. Em algumas áreas, não seria possível a observação do efeito SERS ou talvez não houvesse muita intensificação, uma vez que a banda referente ao plásmon de superfície tem intensidades muito baixas (Figura 4.10).

O mesmo foi feito com o substrato vermelho, porém foi escolhida uma área menor, com apenas 26 espectros. Os resultados do mapeamento do substrato vermelho estão mostrados na Figura 4.11. Podemos observar também uma irregularidade presente na superfície e a presença dos chamados "hot spots", que podem ser observados pelo espectro na parte mais clara do mapa.

Uma vez obtidos estes resultados, passou-se a utilizar apenas o substrato azul nos próximos testes, pois o mesmo demonstrou possuir maior atividade SERS. O substrato branco também foi utilizado como padrão.

O substrato vermelho não apresentou atividade SERS provavelmente devido ao tamanho das nanopartículas constituintes e também ao formato das mesmas, o que não favorecem a intensificação do campo elétrico local.



Figura 4.9- Análise de mapeamento Raman de área no substrato azul (acima) e espectro registrado na parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo).

Fonte: autora da dissertação, 2012.

Figura 4.10- Análise de mapeamento Raman de área no substrato azul (acima) e espectro registrado na parte com coloração menos intensa do mapa (abaixo).



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Figura 4.11- Análise de mapeamento Raman de área no substrato vermelho (acima), espectro registrado da parte com coloração menos intensa do mapa (centro) e espectro registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo).





Fonte: autora da dissertação, 2012.

4.4.2 Tempo de imersão

A fim de investigar a relação entre a intensificação dos sinais referente à piridina e o tempo de imersão do substrato na solução de piridina foram feitas análises Raman em substratos após cinco tempos de imersão diferentes. Todos os testes foram feitos em triplicata e em pontos diferentes da amostra. Os resultados obtidos estão discutidos a seguir.

Com apenas 5 minutos de imersão na amostra de piridina, o substrato demonstrava boa atividade SERS, nos três pontos analisados (Figura 4.12). Em um

dos pontos mostrou intensificação cerca de duas vezes maior, provavelmente pela análise feita em um "hot spot".

Figura 4.12- Espectros Raman obtidos do substrato (pastilha azul), em três pontos diferentes, após imersão por 5 minutos em solução 0,1 mol.L⁻¹ de piridina.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Com um tempo de imersão de 15 minutos, o substrato demonstrou atividade semelhante aos resultados obtidos com tempo de imersão de 5 minutos. Neste caso, todos os pontos exibiram intensificação semelhante das bandas referentes à piridina. Os resultados estão mostrados na Figura 4.13.

Com os outros tempos de imersão (30, 60 e 120 minutos) os resultados também foram semelhantes aos discutidos anteriormente, indicando que o tempo de imersão não tem influência no efeito SERS promovido pelo nosso substrato. Os espectros obtidos podem ser observados nas Figuras 4.14, 4.15 e 4.16.

Figura 4.13- Espectros Raman obtidos do substrato (pastilha azul) em três pontos diferentes após imersão por 15 minutos em solução 0,1 mol.L⁻¹ de piridina.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Figura 4.14- Espectros Raman obtidos do substrato (pastilha azul) em três pontos diferentes, após imersão por 30 minutos em solução 0,1 mol.L⁻¹ de piridina.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Figura 4.15- Espectros Raman obtidos do substrato (pastilha azul) em três pontos diferentes, após imersão por 60 minutos em solução 0,1 mol.L⁻¹ de piridina.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Figura 4.16- Espectros Raman obtidos do substrato (pastilha azul) em três pontos diferentes, após imersão por 120 minutos em solução 0,1 mol.L⁻¹ de piridina.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Através dos testes realizados, podemos concluir que o tempo de imersão dos substratos na solução de piridina não tem relação com o fator de intensificação Raman, o que indica uma rápida adsorção da piridina à superfície das nanopartículas presentes no nosso substrato, uma vez que suas bandas Raman foram observadas com apenas 5 minutos de imersão.

4.4.3 Limite de detecção da piridina

Para o estudo da capacidade de detecção das bandas referentes à piridina adsorvida no nosso substrato, foram analisados substratos (placas) após a imersão em soluções de piridina com variação de concentrações de 10⁻² mol.L⁻¹ a 10⁻⁵ mol.L⁻¹. Para comparação, utilizou-se um substrato sem AuNPs após imersão em uma solução 10⁻³ mol.L⁻¹ de piridina. Os testes foram realizados com um tempo de imersão de 24 h, uma vez que foram utilizadas concentrações muito pequenas de piridina do que a utilizada anteriormente, e para a garantia de total adsorção das moléculas na superfície das nanopartículas.

As análises para este teste foram feita em um espectrômetro FT-Raman pois, como este equipamento faz a leitura de vários espectros em uma área determinada da amostra e soma-os, a existência de "hot spots" não atrapalharia o estudo, tornando-se mais fácil a análise quantitativa da nossa amostra.

Podemos observar na Figura 4.17 que as bandas referentes à piridina mostraram-se intensificadas com uma concentração de até 10⁻⁴ mol.L⁻¹, se compararmos ao espectro de uma solução de piridina de 10⁻³ mol.L⁻¹ em um substrato sem AuNPs, também na mesma figura.

A Figura 4.17 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 (10⁻² 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 está atribuída apenas a ligação Au-N.

Figura 4.17- Espectros FT-Raman obtidos dos substratos (placas) 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 10⁻³ mol.L⁻¹.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

A Figura 4.18 mostra uma melhor visualização da relação entre diferentes concentrações de piridina e a intensificação de suas bandas Raman, que pode ser consideradas diretamente proporcionais.

A partir das intensidades normalizadas dos espectros mostrados na Figura 4.18, um gráfico (Figura 4.19) foi produzido relacionando a intensidade da banda em 1014 cm⁻¹ referente à piridina e sua concentração. Um comportamento quase linear é observado, indicando uma possível utilização para uma curva analítica, para isto, deve-se estender os pontos de concentração analisados.

Figura 4.18- Espectros FT-Raman dos substratos (placas) após imersão em soluções de piridina com diferentes concentrações.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Figura 4.19- Gráfico da intensidade normalizada referente à banda da piridina em 1014 cm⁻¹ em função da concentração.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

O mapeamento do substrato após imersão na solução de piridina com concentração de 10⁻² mol.L⁻¹ foi feito e a imagem foi gerada em relação à banda em 1014 cm⁻¹ da piridina, onde esta possui a maior intensidade na parte da imagem com coloração amarela mais intensa e menor intensidade na parte com coloração amarela menos intensa. Novamente podemos perceber, pela diferença nas colorações, a existência de "hot spots" na imagem mostrada na Figura 4.20. Para a obtenção do mapa mostrado na Figura 4.20, foram registrados 64 espectros distribuídos em uma área retangular da amostra.

Pode ser observado que no ponto onde houve maior intensificação da banda Raman da piridina, este exibiu uma banda referente ao plásmon de superfície também muito intensa, o que era de se esperar com base nos resultados discutidos anteriormente.

Figura 4.20- Mapeamento de área no substrato (placa) após imersão em solução 10⁻² mol.L⁻¹ de piridina (acima) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo).



Fonte: autora da dissertação, 2012.

4.4.4 Variação na concentração de piridina em substratos sem nanopartículas de ouro

Para a observação do fator de intensificação SERS do nosso substrato em relação às bandas Raman da piridina, foram feitas análises do substrato sem AuNPs (branco) após imersão em soluções de piridina com diferentes concentrações. Os espectros Raman resultantes estão mostrados na Figura 4.21, onde podem ser observadas as bandas referentes à piridina presentes no substrato apenas nas concentrações de 2,00; 1,00 e 0,50 mol.L⁻¹.

Estes resultados comprovam, mais uma vez, que o nosso substrato é SERSativo, uma vez que se consegue intensificar as bandas referentes à piridina com uma concentração muito menor (10⁻⁴ mol.L⁻¹) do que sua banda Raman em um substrato sem nanopartículas de ouro, com uma concentração muito maior (0,25 mol.L⁻¹), ou seja, ainda que com uma concentração de 2500 vezes maior de piridina, não podem ser observadas suas bandas Raman sem as nanopartículas de ouro.

Figura 4.21- Espectros Raman obtidos de substratos sem nanopartículas de ouro após imersão em soluções com concentrações de 2,00 mol.L⁻¹, 1,00 mol.L⁻¹, 0,50 mol.L⁻¹ e 0,25 mol.L⁻¹ de piridina.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

A Figura 4.22 apresenta uma comparação entre o espectro de um substrato azul após imersão em solução com 0,01 mol.L⁻¹ de piridina e o espectro de um substrato branco após imersão em solução com 0,50 mol.L⁻¹ de piridina.

Podemos observar uma intensificação dos sinais referentes à piridina em cerca de 3 vezes, com uma solução 50 vezes menos concentrada que o obtido sem as nanopartículas, o que evidencia a atividade SERS do nosso substrato, com nanoestrelas de ouro.

De acordo com a Figura 4.22, pode-se ver claramente a intensidade da banda referente ao plásmon de superfície das nanoestrelas de ouro mais uma vez, em aproximadamente 250 cm⁻¹.

Figura 4.22- Espectros Raman obtidos de substratos sem nanopartículas de ouro (espectro azul) e com nanopartículas de ouro (espectro vermelho) após imersão em soluções com concentrações de 0,50 mol.L⁻¹ e 0,01 mol.L⁻¹ de piridina, respectivamente.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

4.4.5 Utilizando Benzotriazol (BTAH) como molécula sonda

A atividade SERS do substrato foi comprovada nos testes anteriores, porém, com o intuito de estudar sua atividade em relação à molécula sonda de benzotriazol (BTAH), Figura 4.23, foram feitos testes semelhantes aos da piridina.

Figura 4.23- Estrutura molecular do benzotriazol (BTAH).



Fonte: Extraído da referência 80.

Os espectros FT-Raman obtidos para o estudo da concentração de BTAH estão mostrados na Figura 4.24, onde podem ser observadas as principais bandas Raman da molécula de BTAH em 1390 cm⁻¹, 1012 cm⁻¹e 787 cm^{-1 58}.

Figura 4.24- Espectros FT-Raman obtidos dos substratos (placas) após imersão em soluções de BTAH com diferentes concentrações, substrato sem BTAH e substrato sem nanoestrelas (branco) com BTAH 10⁻³ mol.L⁻¹.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Os resultados mostram comportamentos semelhantes com relação à banda Raman do plásmon de superfície, onde pode ser observada a formação de duas bandas com a menor concentração de BTAH (10⁻⁵ mol.L⁻¹), provavelmente atribuídas às ligações Au-N e Au-Au. À medida que sua concentração aumenta as bandas começam a se unir, até a formação de uma única banda com pequena variação de número de onda em relação a banda referente ao plásmon de superfície em um substrato sem a solução de BTAH, que pode ser atribuída apenas à ligação Au-N.

A Tabela 4.2 mostra os números de onda de espectros Raman e de espectros SERS das bandas vibracionais do BTAH apresentadas nos espectros da Figura 4.24, bem como a tentativa de suas atribuições.

Tabela 4.2- Atribuição-tentativa vibracional para os espectros do BTAH nos substratos, de acordo com a referência 58.

Raman normal (cm ⁻¹)	SERS (cm ⁻¹)	Atribuição tentativa
1388s [*]	1390	Estiramento do anel triazol
1017s	1013	Respiração do anel no plano trigonal
779s	787	Respiração do anel benzênico
-	279	Estiramento Au-Au
-	246	Estiramento Au-N

s - intensidade forte

Fonte: autora da dissertação, 2012.

A Figura 4.25 mostra uma melhor visualização da relação entre diferentes concentrações de BTAH e a intensificação de suas bandas Raman.

Para estudar uma possível linearidade entre a intensidade das bandas referentes ao BTAH e a sua concentração, foram gerados dois gráficos, mostrados nas Figuras 4.26 e 4.27. A Figura 4.26 está relacionada à intensidade da banda em aproximadamente 790 cm⁻¹ e a Figura 4.27, à banda em 1390 cm⁻¹. Os dois gráficos, a partir de certo ponto, mostram um comportamento linear, assim como o discutido no caso da piridina, podendo talvez ser usados, com uma maior elaboração, como uma curva analítica. Tendo o primeiro (Figura 4.26) um aspecto mais linear que o segundo (Figura 4.27).

Figura 4.25- Espectros FT-Raman dos substratos (placas) após imersão em soluções de benzotriazol com diferentes concentrações.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Figura 4.26- Gráfico da intensidade normalizada referente à banda do benzotriazol em 790 cm⁻¹ em função de sua concentração.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Figura 4.27- Gráfico da intensidade normalizada referente à banda do benzotriazol em 1390 cm⁻¹ em função de sua concentração.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Da mesma forma que os estudos anteriores, também foi feito o mapeamento de um substrato após a imersão em uma solução de BTAH com a concentração de 10⁻² mol.L⁻¹ (Figura 4.28).

Figura 4.28- Análise de mapeamento de área no substrato (placa) após imersão em solução 10⁻² mol.L⁻¹ de BTAH (acima) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo).



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Neste estudo foi escolhida a banda em 790 cm⁻¹ como referência para a geração da imagem do mapa. Nesta figura a maior intensidade está demonstrada onde a coloração lilás é mais intensa e menor intensidade, onde a coloração lilás é menos intensa.

Estes estudos indicam que o nosso substrato possui uma boa atividade SERS tanto em relação à molécula da piridina quanto à molécula de BTAH, podendo detectar a molécula de BTAH em concentrações ainda menores que a piridina.

4.4.6 Utilizando Rodamina 6G (R6G) como molécula sonda

O substrato também foi testado em relação à molécula sonda de Rodamina 6G (R6G), Figura 4.29. Este teste foi realizado com uma concentração de 10⁻³ mol.L⁻¹.





Fonte: Extraída da referência 81.

Foi possível avaliar o substrato com à molécula de R6G, onde foram observadas suas bandas Raman características em 1507 cm⁻¹, 1359 cm⁻¹, 1186 cm⁻¹, 770 cm⁻¹ e 611 cm^{-1 55} no substrato. As mesmas bandas não foram observadas no substrato sem as AuNPs. Os espectros resultantes podem ser vistos na Figura 4.30.

Pode-se observar também a modificação da banda referente ao plásmon de superfície, em aproximadamente 250 cm⁻¹, no substrato após a imersão na solução de R6G, pela formação de duas bandas e seu deslocamento, podendo ser atribuídas às ligações Au-N e Au-Au, indicando a interação direta da molécula com a superfície das nanopartículas de ouro presentes no substrato.
Figura 4.30- Espectros FT-Raman obtidos do substrato (placa) após imersão em solução de R6G com concentração de 10⁻³ mol.L⁻¹, substrato sem R6G e substrato sem AuNPs com R6G 10⁻³ mol.L⁻¹.



Fonte: autora da dissertação, 2012.

A Tabela 4.3 mostra os números de onda e as intensidades relativas às bandas vibracionais da R6G apresentadas nos espectros da Figura 4.30, bem como a tentativa de suas atribuições.

Em uma área retangular da amostra após a imersão na solução de R6G foi feito o mapeamento da banda em 1359 cm⁻¹, mostrado na Figura 4.31. A área com coloração vermelha mais intensa indica uma maior intensificação desta banda referente à R6G e uma coloração menos intensa indica menor intensificação da referida banda.

Raman normal (cm ⁻¹)	SERS (cm ⁻¹)	Atribuição tentativa [*]
1513	1507	v C-C arom
1361	1359	ν C-C arom + ν C-N (?)
1179	1186	δ C-H + ν C-C (?)
768	770	γ C-H
610	611	δ C-C-C anel
-	277	ν Au-N
-	237	ν Au-Au
-	174	ν Au-N

Tabela 4.3- Atribuição-tentativa vibracional para os espectros da R6G nos substratos, de acordo com as referências 82 e 83.

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

Figura 4.31- Análise do mapeamento de área no substrato após imersão em solução 10⁻³ mol.L⁻¹ de R6G (acima) e espectro Raman registrado da parte com coloração mais intensa do mapa (abaixo).



Fonte: autora da dissertação, 2012.

Os resultados nos mostram a eficiência do substrato SERS-ativo obtido, uma vez que este demonstrou boas atividades em relação às três moléculas sonda utilizadas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de caracterização utilizadas nos permitiram observar a formação de nanopartículas de ouro com formas e tamanhos diferentes através da mesma rota sintética, apenas variando a relação de concentração entre o ouro e o agente redutor no meio⁵⁹.

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 ou até mesmo igual a anterior.

A partir do primeiro teste, pode-se perceber que o substrato com nanopartículas de ouro na forma de estrela obteve os melhores resultados em relação à intensificação das bandas referentes à piridina, por isso, foi escolhido para novos testes.

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.

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, pode ser utilizado para análises de investigação qualitativas e quantitativas por Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície, uma vez que em vários testes foi possível a observação de bandas relacionadas às moléculas sonda utilizadas (piridina, benzotriazol e Rodamina 6G) em diferentes concentrações e as mesmas não foram observadas no substrato produzido sem nanopartículas de ouro e com até concentrações maiores.

6 PERSPECTIVAS

Podemos citar como perspectivas para trabalhos futuros:

- Estudo da reprodutibilidade do nosso substrato, assim como o tempo em que a piridina permanece adsorvida, podendo, talvez, reutilizar o substrato após suas análises com piridina;
- Síntese de nanopartículas no formato de estrelas com tamanhos menores;
- Achar o limite detecção para diferentes moléculas sonda;
- Fazer uma curva de calibração utilizando nanopartículas de diferentes tamanhos a fim de avaliar o tamanho da nanopartícula a partir das intensidades das bandas referentes ao plásmon de superfície das mesmas.

Pode ser testada também a aplicação do substrato na detecção de novas moléculas sonda, como por exemplo, o estudo de tióis, entre outros grupos orgânicos que tenham afinidade pela superfície do ouro, e que sejam difíceis de identificar por outro método.

Outra possível aplicação para o substrato obtido seria a tentativa de detecção de uma única molécula, através do método chamado "Single Molecule Detection".

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

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

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

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

8. 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.

9. 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.

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

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

12. DANOSO, J. P., **Espectroscopia Infravermelha: Moléculas**, IFSC, São Paulo. Disponível em: http://www.ifsc.usp.br/~donoso/espectroscopia/. Acesso em: 13 mar. 2012.

13. FATOBENE, T. J., **Espectroscopia Raman**, Perkin Elmer, 2008. Disponível em: http://www.metalmat.ufrj.br/seminarios/. Acesso em: 13 mar. 2012.

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

15. 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.

16. BAKER, G. A.; MOORE, D. S. Progress in plasmonic engineering of surfaceenhanced Raman-scattering substrates toward ultra-trace analysis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 382, p. 1751-1770, 2005.

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

18. SPECTROSCOPY Applications - Raman. Princeton Instruments. Disponível em: http://www.princetoninstruments.com/spectroscopy/. Acesso em: 13 mar. 2012.

19. 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.

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

21. 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.

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

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

24. *O que é LASER*? Disponível em: http://www.tecmundo.com.br/video-game/1062-o-que-e-laser-.htm. Acesso em: 14 mar. 2012.

25. MENDONÇA, S. Laser de alta e baixa potência – Os fundamentos da física do laser. Disponível em: br/>http://www.ebah.com.br/>http://www.ebah.com.br/>br/>http://www.ebah.com.br/>http://ww

26. SOUZA, C. M. Espectrofotometria Raman uma Contribuição da Física nas **Perícias Forenses**, 2009. Disponível em: http://www.webartigos.com/autores/jiraya07/. Acesso em: 14 mar. 2012.

27. LABORATÓRIO de Espectroscopia Molecular – LEM. Disponível em: http://lem.iq.usp.br/laboratorio.html. Acesso em: 14 mar. 2012.

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

29. 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.

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

31. 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.

32. 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.

RAMAN Spectroscopy Applications. Renishaw. Disponível em:
 http://www.renishaw.com/en/raman-spectroscopy-applications--6259. Acesso em: 14 mar. 2012.

34. 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.

35. 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.

36. 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.

37. JOHNSON, R. P. et al. SERS from two-tier sphere segment void substrates. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 13, n. 37, p. 16661-16665, 2011.

38. 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.

39. 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.

40. 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.

41. RAMAN: Application. **UCDAVIS CHEMWIKI**. Disponível em: <http://chemwiki.ucdavis.edu/Wikitexts/UCD_Chem_205:_Larsen/ChemWiki_Module _Topics/Raman:_Interpretation#Applications>. Acesso em: 15 mar. 2012.

42. 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.

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

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

45. EFEITO Túnel. **Wikipedia**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/>. Acesso em: 15 mar. 2012.

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

47. BANHOLZER, M. J. et al. Rationally designed nanostructures for surfaceenhanced Raman spectroscopy. **Chem. Soc. Rev.**, v. 37, p. 885-897, 2008.

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

49. SURFACE Enhanced Raman Spectroscopy. **Wikipedia.** Disponível em: ">http://en.wikipedia.org/wiki/>. Acesso em: 15 mar. 2012.

50. 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.

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

52. ROGUSKA, A. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) activity of Ag, Au and Cu nanoclusters on TiO_2 -nanotubes/Ti substrate. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 8182-8189, 2011.

53. NIE, S.; EMORY, S. R. Probing single molecules and single nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. **Science**, v. 275, p. 1102-1106, 1997.

54. LU, L. et al. Fabrication of core-shell Au-Pt nanoparticle film and its potential application as catalysis and SERS substrate. **J. Mater. Chem.**, v. 14, p. 1005-1009, 2004.

55. SANTOS, D. P. et al. Produção de substratos SERS eficientes através da deposição de ouro sobre um molde de microesferas de poliestireno. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2093-2097, 2010.

56. COSTA, L. A. F.; BREYER, H. S.; RUBIM, J. C. Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) on copper electrodes in 1-n-butyl-3-methylimidazoliun tetrafluorbarate (BMI.BF4): The adsorption of benzotriazole (BTAH). **Vibrational Spectroscopy**, v. 54, p. 103-106, 2010.

57. RUBIM, J. C.; GUTZ, I. G. R.; SALA, O. Surface-Enhanced Raman Spectra of benzotriazole adsorbed on a silver electrode. **Journal of Molecular Structure**, v. 101, p. 1-6, 1983.

58. THOMAS, S. et al. Surface Enhanced Raman Scattering of benzotriazole: a molecular orientational study. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 60, p. 25-29, 2004.

59. MORAIS, S. F. A. et al. **Síntese de Nanoestrelas de Ouro em Óleo de Mamona**. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 33., 2010, Águas de Lindóia. Anais... São Paulo: 2010.

60. 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.

61. 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.

62. WHAT we use. Disponível em: http://research.chem.psu.edu/bulgroup/Equipment.html. Acesso em: 15 mar. 2012.

63. BRUKER Equinox 55 FTIR/FTNIR Spectrometer. Disponível em: http://www.nir-spektroskopie.de/geraete/equinoxe.htm. Acessado: 14/03/2012.

64. 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 e Biotecnologia)- Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

65. RESSONÂNCIA Plasmônica e as Cores das Nanopartículas. Olhar Nano. Disponível em: http://www.olharnano.com/. Acesso em: 15 mar. 2012.

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

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

68. CULTIVO da mamona. **EMBRAPA.** Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/CultivodaMam ona_2ed/oleo.html>. Acesso em: 25 jul. 2012.

69. ALBUQUERQUE, A. R. **Autoxidação de ésteres metílicos de ácidos graxos:** Estudo teórico-experimental. 2010. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

70. 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.

71. 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.

72. JACINTHO, G. V. M. et al. Structural investigation of MFe_2O_4 (M = Fe, Co) magnetic fluids. J. Phys. Chem. C, v. 113, p. 7684-7691, 2009.

 73. 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.

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

75. 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.

76. 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.

77. POTAPKINA, E. V. et al. Investigation of pyridine–Ag(X), (X = NO_3^- , CIO_4^-) aqueous solutions: SERS and Raman study supported by NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 996, p. 128-134, 2011.

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

79. PYRIDINE. Wikipedia. Disponível em:

http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Pyridine_chemical_structure.png>. Acesso em: 16 mar. 2012.

80. BENZOTRIAZOLE. **Wikipedia**. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Benzotriazole_-_numbered.png>. Acesso em: 16 mar. 2012.

81. RODAMINA. **Wikipedia**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Rodamina>. Acesso em: 16 mar. 2012.

82. HILDEBRANDT, P.; STOCKBURGER, M., J. Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy of rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver. **Phys. Chem.**, v. 88, p. 5935-5944, 1984.

83. MAJOUBE, M.; HENRY, M. Fourier transform Raman and infrared and Surface-Enhanced Raman spectra for rhodamine 6G. **Spectrochimica Acta**, v. 47A, n. 9/10, p. 1459-1466, 1991.