

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOCTORADO EM QUÍMICA

Débora Guimarães de Oliveira

Utilização de quitosana no controle sobre a formação de *hot spots* e protetor superficial de nanoesferas de ouro para estudos de adsorção por Espalhamento Raman Intensificado por Superfície

Juiz de Fora
2018

Débora Guimarães de Oliveira

Utilização de quitosana no controle sobre a formação de *hot spots* e protetor superficial de nanoesferas de ouro para estudos de adsorção por Espalhamento Raman Intensificado por Superfície

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Química. Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade.

Juiz de Fora

2018

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por sempre estar ao meu lado e me dar força para alcançar os objetivos. Seguindo os agradecimentos, dedico ao outro suporte fundamental para que eu pudesse concluir este trabalho: “*Minha Família*”. Em especial aos meus pais Esmeraldo e Maria Aparecida, à minha irmã Daiane e ao meu *noivo* Ezequiel, por sempre me incentivarem e apoiarem em minhas escolhas, independente da caminhada. Não posso deixar de dedicar este trabalho aos professores do Departamento de Química da UFJF, que me auxiliaram em diversos momentos de dificuldade e desespero, em especial ao meu querido orientador e exemplo de profissional a ser seguido: Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca ter me abandonado e ouvido sempre as minhas orações, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira por ter sido tão solícito ao me conhecer, e me apresentar às linhas de pesquisa do PPGQ-UFJF e ao meu atual orientador Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade.

Também não posso esquecer os agradecimentos à sua esposa e também Prof.(a) no Departamento de Química do ICE: Dr(a) Rosana Colombara, pelo apoio e confiança de sempre, além da oportunidade de assistir às suas aulas como aluna ouvinte.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade por toda educação, paciência, compreensão e dedicação na orientação à qual eu recebi. Com certeza sem a sua persistência em incentivar os alunos no desenvolvimento da pesquisa, ao meio de diversas dificuldades, este trabalho não teria se concretizado. Em um momento em que vários alunos de diversas Universidades do País passam por dificuldades psicológicas, eu relato que as várias conversas, conselhos, além da preocupação com a saúde psicológica do estudante, que o prof. Gustavo sempre teve, foi importantíssimo para eu não desistir no meio do caminho. Muito obrigada pelo exemplo de profissional, com certeza é o exemplo que eu quero seguir em minha vida profissional.

Aos professores com quem eu tive a oportunidade de fazer disciplinas, tanto como aluno matriculado como ouvinte. Com certeza foi muito importante para o meu crescimento profissional!

Aos professores do grupo LabNano pelas conversas e ensinamentos em reuniões de grupo e pessoalmente em suas salas de trabalho, especialmente ao Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana e à Prof(a) Dr(a) Celly Mieko Shinohara Izumi.

Ao INMETRO, instituição parceira, pela disponibilidade em realizar as análises de MEV.

Ao professor Santiago Sánchez-Cortés, pelos ensinamentos e sugestões durante sua vinda ao Brasil visitando o PPG em Química UFJF, que culminaram na publicação de um artigo relacionado a esta tese apresentada.

A todos os integrantes e amigos do LabNano, que no momento em que eu estive presente no laboratório pude conhecer e conviver. Obrigada por todo o carinho, paciência e pelos momentos de descontração. Não citei nomes para não correr o risco de eu esquecer alguém, mas todos foram muito importantes em minha vida!

Aos funcionários de serviços gerais que contribuíram nas limpezas e organizações dos laboratórios. Obrigada!

À agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro, na forma de uma bolsa de doutorado, para o desenvolvimento de pesquisa, publicações de artigos e desta tese.

Às agências de fomento FAPEMIG, CNPq e UFJF pelo apoio de material e pelo auxílio financeiro nas realizações dos trabalhos do grupo.

“O passado é uma cortina de vidro. Felizes os que observam o passado para poder caminhar
no futuro.”
(Augusto Cury)

RESUMO

A proteção superficial de nanoesferas de ouro (AuNEs) pode fornecer uma maior estabilidade coloidal, importante quando se trabalha com sistemas biológicos, por apresentarem situações diversas que podem levar à agregação das AuNEs. O biopolímero quitosana (Quit) é um material atóxico, apresenta baixo custo, e vem sendo muito utilizado em sistemas biológicos para diagnóstico de doenças. Sistemas sensíveis, como os biossensores utilizados na detecção de moléculas adsorvidas em AuNEs, podem ser monitorados por mudança na banda de ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR) e pela utilização da técnica de espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS). Quando as moléculas são adsorvidas nas superfícies das AuNEs é possível observar a indução de agregação da suspensão coloidal pela mudança na banda LSPR. Devido à sensibilidade analítica, as superfícies das AuNEs são protegidas para evitar agregação e precipitação coloidal, e a obtenção de resultados falso-positivos. Esta tese teve como objetivo realizar vários estudos utilizando as AuNEs protegidas superficialmente por Quit para oferecer uma maior estabilidade e controlar a formação de *hot spots* na presença do analito. Para tal, sempre foram realizados experimentos comparando as AuNEs com e sem proteção superficial por Quit. Os estudos iniciais observaram a resistência à agregação das AuNEs com relação ao tempo de exposição em temperatura ambiente. Seguindo o raciocínio as AuNEs também foram expostas à diferentes concentrações dos agentes agregantes etanol (EtOH) e KCl. Os analitos utilizados como molécula prova para o SERS e também para observar possíveis mudanças na banda LSPR, foram os corantes: cristal violeta (CV), rodamina 6G (R6G) e IR-820, que apresentam cargas superficiais positiva ou negativa; a fim de identificar alguma preferência na adsorção por carga superficial do analito. Para os estudos em espectroscopia SERS, foram realizadas medidas variando concentração de Quit na presença dos corantes juntos ou separados, além de observar a interferência na ordem de adição do corante no sinal SERS. A Quit se mostrou promissora para aumentar a estabilidade das AuNEs e, portanto, experimentos para tentar modular e controlar a formação de *hot spots* foram realizados. O efeito SERS foi utilizado como uma ferramenta analítica em que foi estudada a relação direta do sinal SERS obtido dos corantes, com a sua concentração em solução. A partir destes resultados, foi possível construir isotermas de adsorção dos corantes estudados, que foram ajustadas ao modelo de Langmuir.

Palavras-chave: Quitosana. Proteção superficial. Estabilidade. Nanoesferas de Au. Isoterma de adsorção. Corantes. SERS.

ABSTRACT

The surface protection of gold nanospheres (AuNEs) can provide greater colloidal stability, important when work with biological system, because the present diverse situations that can lead to the aggregation of AuNEs. The chitosan biopolymer (Quit) is a non-toxic material, presents low cost, and has been widely in biological systems for the diagnosis of diseases. Sensitive systems, such as biosensors used in detection of adsorbed molecules in AuNEs, can be monitored by changing in Localized Surface Plasmon Resonance's band (LSPR) and by use of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy technique (SERS). When the molecules are adsorbed on the AuNEs surfaces is possible to observe the induction of aggregation of the colloidal suspension by the change in the LSPR band. Due to the analytical sensitivity, the surfaces of the AuNEs are protected to avoid aggregation and colloidal precipitation, and to obtain false positive results. This thesis aimed to perform several studies using the AuNEs surface protected by Quit to offer greater stability and to control the formation of *hot spots* in the presence of the analyte. For this, experiments were always done to compare the AuNEs with and without surface protection by Quit. The initial studies observed the resistance to AuNEs aggregation in relation to exposure time at room temperature. Following the reasoning, the AuNEs were also exposed to different concentrations of the aggregating agents ethanol (EtOH) and KCl. The analytes that were used as a test molecule for the SERS and also to observe possible changes in the LSPR band were the dyes: crystal violet (CV), rhodamine 6G (R6G) and IR-820, which have positive or negative surface charges; in order to identify some preference in surface adsorption of the analyte. For the SERS spectroscopy studies, measurements were performed varying the concentration of Quit in the presence of the dyes together or separated, besides observing the interference in the order of dye addition in the SERS signal. The Quit proved promising to increase the stability of AuNEs and, therefore, modification experiments, aiming at modulate and control the formation of *hot spots*, were performed. The SERS effect was used as an analytical tool in which the direct relationship of the SERS signal obtained from the dyes with their concentration in solution was studied. From these results, it was possible to construct adsorption isotherms of the studied dyes, which were adjusted to the Langmuir model.

Keywords: Chitosan. Surface protection. Stability. Gold nanospheres. Adsorption isotherm. Dyes. SERS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da LSPR em esfera metálica.	18
Figura 2 – Fator de qualidade de diferentes metais na região espectral: 200 a 1200 nm.	20
Figura 3 – Representação esquemática do processo de síntese de AuNEs segundo	22
Figura 4 – Representação da agregação de AuNEs na presença de um analito.	23
Figura 5 – Fórmula molecular estrutural do biopolímero quitosana.	25
Figura 6 – Esquema dos mecanismos de espalhamento.	29
Figura 7 – Diferentes representações de isotermas de adsorção.	33
Figura 8 – Montagem dos experimentos para o estudo de estabilidade das AuNEs utilizando a Quit como protetor superficial.	38
Figura 9 – Montagem experimental para a realização do estudo de indução da agregação das AuNEs por KCl e EtOH.	39
Figura 10 – Montagem do experimento para a caracterização dos corantes por UV-VIS.	40
Figura 11 – Procedimento experimental do estudo de interação das AuNEs com Quit como protetor superficial e os corantes estudados.	41
Figura 12 – Procedimento experimental para o estudo do sinal SERS da R6G pelo controle na formação de <i>hot spots</i>	43
Figura 13 - Procedimento experimental para o estudo do sinal SERS da R6G pelo controle na formação de <i>hot spots</i> na presença do agente agregante KCl.	44
Figura 14 – Método para a construção das isotermas de adsorção de corantes em AuNEs pelo monitoramento da intensidade relativa SERS.	45
Figura 15 – (a) Espectro de extinção no UV-VIS das AuNEs de acordo com a síntese de Frens (1973). (b) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da síntese das AuNEs.	46
Figura 16 – Espectro de absorção no UV-VIS das soluções dos corantes CV, R6G e IR-820 e suas estruturas moleculares, concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	47
Figura 17 – (a) Espectros UV-VIS das AuNEs na ausência e presença do biopolímero Quit; (b) Espectro UV-VIS das mesmas soluções após um tempo de repouso de seis dias à temperatura ambiente.	49
Figura 18 – Espectro UV-VIS de extinção da AuNEs: (A) e (B) agregação por etanol; (C) e (D) agregação por KCl, sendo (A) e (C) AuNEs sem proteção superficial por Quit e (B) e (D) AuNEs protegidas por Quit.	50
Figura 19 – Espectro UV-VIS da interação entre AuNEs na presença de dois corantes de concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	52

Figura 20 – Espectro UV-VIS das AuNEs sem proteção superficial por Quit na presença de IR-820, R6G e CV ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹).	53
Figura 21 – (a) Espectro UV-VIS das AuNEs com proteção superficial por Quit (0,1 g L ⁻¹) na presença de IR-820, R6G e CV ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) . (b) Ampliação do espectro em (a) na região do máximo da banda de absorção.	54
Figura 22 – SERS em AuNEs do IR-820 e R6G, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L ⁻¹ ; b) 0,01 g L ⁻¹ ; c) 0,1 g L ⁻¹ ; d) 1,0 g L ⁻¹	57
Figura 23 – SERS em AuNEs do CV e IR-820, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L ⁻¹ ; b) 0,01 g L ⁻¹ ; c) 0,1 g L ⁻¹ ; d) 1,0 g L ⁻¹	57
Figura 24 – SERS em AuNEs do CV e R6G, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L ⁻¹ ; b) 0,01 g L ⁻¹ ; c) 0,1 g L ⁻¹ ; d) 1,0 g L ⁻¹	58
Figura 25 – Espectro SERS das AuNEs na presença de: (A) R6G ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹); (B) Quit 0,01 g L ⁻¹ ; (C) Quit (0,01 g L ⁻¹) + R6G ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹).	61
Figura 26 – Espectro SERS das AuNEs: 500 - 1800 cm ⁻¹ : Preto (protegidas por Quit (0,01 g L ⁻¹) + R6G ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)); Vermelho (agregação por KCl + R6G ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)); azul (agregação KCl + proteção por Quit (0,01 g L ⁻¹) + R6G ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)).	63
Figura 27 – Representação esquemática das interações entre AuNEs e o corante R6G em três configurações experimentais diferentes.	64
Figura 28 – Espectro SERS do CV em diferentes concentrações molares (mol L ⁻¹): a) $1,0 \times 10^{-8}$, b) $4,0 \times 10^{-8}$ c) $7,0 \times 10^{-8}$, d) $1,0 \times 10^{-7}$, e) $1,0 \times 10^{-6}$, f) $1,0 \times 10^{-5}$. Espectro SERS (1500 a 1700 cm ⁻¹) são de 5 replicatas para cada concentração com AuNEs protegidas por Quit (0,10 g L ⁻¹).	66
Figura 29 – Espectro SERS do IR-820 em diferentes concentrações molares (mol L ⁻¹). a) $1,0 \times 10^{-7}$, b) $1,0 \times 10^{-6}$ c) $1,0 \times 10^{-5}$, d) $3,0 \times 10^{-5}$, e) $5,0 \times 10^{-5}$, f) $7,0 \times 10^{-5}$, g) $1,0 \times 10^{-4}$. Espectro SERS (1000 a 1800 cm ⁻¹) são de 5 replicatas para cada concentração com AuNEs protegidas por Quit (0,10 g L ⁻¹).	67
Figura 30 – Espectro SERS da R6G em diferentes concentrações molares (mol L ⁻¹): a) $1,0 \times 10^{-6}$, b) $1,0 \times 10^{-5}$ e c) $1,0 \times 10^{-4}$. Espectro SERS (400 a 1600 cm ⁻¹) são de 5 replicatas para cada concentração com AuNEs protegidas por Quit(0,10 g L ⁻¹).	68
Figura 31 – Ajuste de curva para Langmuir da adsorção do CV, usando a intensidade relativa SERS da banda em 1618 cm ⁻¹ . O gráfico no inserto mostra o ajuste linear do inverso da concentração molar de CV pelo inverso da intensidade relativa SERS.	69
Figura 32 – Ajuste de curva para Langmuir da adsorção do IR-820, usando a intensidade relativa SERS da banda em 1360 cm ⁻¹ . O gráfico no inserto mostra o ajuste linear ao inverso da concentração molar de CV pelo inverso da intensidade relativa SERS.	70
Figura 33 – Testes iniciais para a construção de filmes de Quit com AuNEs e sua solubilidade em solução aquosa.	82
Figura 34 – Modificação superficial de AuNEs com a imobilização da proteína BSA.	83

Figura 35 – Estabilidade dos AuNRs à temperatura ambiente: a) sem proteção superficial, b) com proteção superficial por Quit.	85
Figura 36 – Estudo por UV-VIS da agregação dos AuNRs induzido por etanol: a) sem proteção superficial por Quit; b) com proteção superficial por Quit 0,1 g L ⁻¹	85
Figura 37 – Estudo por UV-VIS da agregação das AuNRs induzido por KCl: a) sem proteção superficial por Quit; b) com proteção superficial por Quit 0,1 g L ⁻¹	86
Figura 38 – SERS dos corantes IR-820 e catiônico R6G em AuNRs, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L ⁻¹ ; b) 0,01 g L ⁻¹ ; c) 0,1 g L ⁻¹ ; d) 1,0 g L ⁻¹	86
Figura 39 – SERS dos corantes CV e IR-820 em AuNRs, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L ⁻¹ ; b) 0,01 g L ⁻¹ ; c) 0,1 g L ⁻¹ ; d) 1,0 g L ⁻¹	87
Figura 40 – SERS dos corantes CV e R6G em AuNRs, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L ⁻¹ ; b) 0,01 g L ⁻¹ ; c) 0,1 g L ⁻¹ ; d) 1,0 g L ⁻¹	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ordem da adição das soluções para as medidas SERS.....	56
Tabela 2 – Intensidade relativa SERS das bandas da R6G em três diferentes condições: AuNEs adicionado Quit seguido de R6G; AuNEs adicionado KCl seguido de R6G; e AuNEs adicionado KCl seguido de Quit e posteriormente R6G.	63
Tabela 3 – Parâmetros de adsorção obtidos do ajuste de Langmuir para os resultados SERS do CV e IR-820 nas AuNEs protegidas por Quit.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NPs	Nanopartículas
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNEs	Nanoesferas de ouro
UV-VIS	Ultravioleta - Visível
<i>SP</i>	plasmon de superfície
LSPR	Ressonância de plasmon de superfície localizado
SERS	Espalhamento Raman Intensificado por Superfície
CV	Corante Cristal Violeta
IR	Corante IR-820
R6G	Corante Rodamina 6G
Quit	Quitossana
<i>seed</i>	Crescimento de sementes
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

LISTA DE SÍMBOLOS

ω	Frequência
ω_p	Frequência do plasma
ω_{\max}	Frequência máxima da banda LSPR
γ	Constante de amortecimento
$\varepsilon(\omega)$	Função dielétrica do metal
λ	Comprimento de onda
ε_m	Constante dielétrica
λ_{\max}	Comprimento de onda da banda LSPR
n_m	Índice de refração do meio circundante
$h\nu_0$	Fóton de energia no estado eletrônico e vibracional fundamental
e_ν	Fóton de energia espalhada
α	Tensor polarizabilidade
\vec{E}	Vetor campo elétrico
ν_0	Radiação incidente
ν_k	Radiação espalhada
$I_{\text{SERS}}(\nu_S)$	Intensidade do sinal SERS
N	Número de moléculas espalhadoras
$I(\nu_L)$	Intensidade da radiação excitante
$E(\nu_L)$	Campo elétrico da radiação excitante
$E(\nu_S)$	Campo elétrico da radiação espalhada
$\sigma_{\text{ads}}^{\text{R}}$	Seção de choque Raman da molécula
I_S	Intensidade relativa SERS do corante na concentração [A]
K_{ad}	Constante de adsorção do corante na superfície do Au
I_{sm}	Intensidade relativa SERS na condição de saturação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	MATERIAIS PLASMÔNICOS.....	16
1.2	NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E SUAS PROPRIEDADES ÓTICAS	17
1.3	NANOESEFERAS DE OURO: SÍNTESE E APLICAÇÃO	20
1.4	ESTABILIDADE DAS NANOESEFERAS DE OURO: AGREGAÇÃO versus PRECIPITAÇÃO.....	22
1.5	PROTEÇÃO SUPERFICIAL DE NANOESEFERAS DE OURO	24
1.6	O BIOPOLÍMERO QUITOSANA	25
1.6.1	Quitosana como um protetor superficial em nanopartículas metálicas	26
1.7	A ESPECTROSCOPIA RAMAN E O EFEITO SERS	26
1.7.1	Mecanismo eletromagnético	30
1.7.2	Mecanismo químico.....	31
1.8	O PROCESSO DE ADSORÇÃO	32
1.8.1	Isotermas de Langmuir	34
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVOS GERAIS	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	PARTE EXPERIMENTAL	36
3.1	REAGENTES	36
3.2	INSTRUMENTAÇÃO	36
3.2.1	UV - VIS.....	36
3.2.2	Espectroscopia SERS.....	36
3.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
3.3	PROCEDIMENTOS	37
3.3.1	Síntese e caracterização das AuNEs	37
3.3.2	Montagem dos experimentos para o estudo de estabilidade das AuNEs utilizando a Quit como um protetor superficial	38
3.3.3	Procedimento para o estudo de indução da agregação das AuNEs por KCl e EtOH	39
3.3.4	Caracterização dos corantes e sua influência na banda LSPR das AuNEs	40
3.3.5	Interação das AuNEs com quitosana como protetor superficial e os corantes	40
3.3.6	Influência na intensificação do sinal SERS pela ordem de adição do corante	42
3.3.7	Experimentos para a modulação do sinal SERS da R6G pelo controle na formação de <i>hot spots</i>	42
3.3.8	Construção das isotermas de adsorção dos corantes adsorvidos em AuNEs pelo monitoramento da intensidade relativa SERS	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46

4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AuNEs E CORANTES POR ESPECTROSCOPIA NO UV-VIS	46
4.2	ESTABILIDADE DAS AuNEs NA PRESENÇA DE QUITONASA COMO UM PROTETOR SUPERFICIAL.....	47
4.3	INDUÇÃO DA AGREGAÇÃO DAS AuNEs POR AGENTES AGREGANTES	50
4.4	INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE DOIS CORANTES NO PLASMON DE SUPERFÍCIE DAS AuNEs.....	51
4.5	ESTUDO UV-VIS DA INTERAÇÃO SUPERFICIAL DE AuNEs PROTEGIDAS POR QUITOSANA COM DIFERENTES CORANTES.....	53
4.6	INFLUÊNCIA DA ORDEM DE ADIÇÃO DOS CORANTES NAS AuNEs PARA INTENSIFICAÇÃO DO SINAL SERS.....	55
4.7	MODULAÇÃO DA INTENSIDADE DO SINAL SERS DA R6G EM AuNEs PROTEGIDAS POR QUITOSANA.....	60
4.8	ESTUDO DA ADSORÇÃO DE CORANTES POR ESPECTROSCOPIA SERS EM AuNEs PROTEGIDAS POR QUITOSANA	65
4.8.1	Construção das Isotermas de adsorção.....	68
5	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
	APÊNDICE	81
1	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	81
1.1	ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE NANOBASTÕES DE Au COM O BIOPOLÍMERO QUITOSANA COMO PROTETOR SUPERFICIAL	81
1.2	CONSTRUÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM AuNEs	81
1.3	IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS EM AuNEs MODIFICADAS	82
1.4	ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE DAS AuNEs COM E SEM PROTEÇÃO SUPERFICIAL POR QUITOSANA.....	83
	ANEXO 1	85
	ANEXO 2	88

1 INTRODUÇÃO

Ensaio colorimétricos baseados em nanopartículas (NPs) de metais de cunhagem Ag, Au e Cu, têm chamado muito a atenção e sido alvo de investimento em pesquisas, por estas apresentarem propriedade de ressonância de plasmon de superfície (YE *et al.*, 2015). As NPs quando em contato com uma fonte de luz podem fornecer uma resposta espectral que se encontra diretamente relacionada com as propriedades do metal, como a forma, geometria e coeficiente de extinção. Podemos citar como exemplo as nanopartículas de ouro (AuNPs), que apresentam um coeficiente de extinção extremamente elevado, intensa absorção e dispersão nas regiões espectrais do visível e infravermelho próximo (AILI *et al.*, 2009; CHANANA; LIZ-MARZÁN, 2012; CHEN *et al.*, 2008).

A presença de um analito adsorvido ou nas proximidades das AuNPs pode ser identificado por uma mudança na banda LSPR (do inglês *Localized Surface Plasmon Resonances*) da suspensão coloidal, devido à mudança no índice de refração local nas proximidades da superfície metálica, induzida pela presença do analito, e que pode ser identificado visualmente pela mudança de cor da suspensão coloidal (BORGHEI *et al.*, 2016; DOYEN *et al.*, 2016; YE *et al.*, 2015). A magnitude do deslocamento pode ser correlacionada com a natureza e a concentração da espécie adsorvida (WILLETS; VAN DUYNÉ, 2007).

O fenômeno descrito no parágrafo anterior é um exemplo de sensor colorimétrico. Os sensores colorimétricos são muito simples, em geral apresentam alta sensibilidade e baixo custo. Além disso, pode ser possível observar as mudanças espectrais instrumentalmente, já que podem ser detectadas facilmente por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-VIS). Devido a essa facilidade, esse tipo de sistema vem sendo utilizado para construção de biossensores.

O grande desafio de se trabalhar com suspensão coloidal metálica é a construção de sistemas estáveis, porque as AuNPs apresentam instabilidade devido à presença de forças atrativas de van der Waals interpartículas, que devem ser contrabalançadas por repulsões eletrostáticas. Quando não há o correto balanço de cargas, pode ocorrer aglomeração das AuNPs (formação de *clusters*) (SOKOLOV; KATELHON; COMPTON, 2015). O grande problema é que nem sempre se consegue controlar essa agregação, o que torna inviável a sua aplicação para qualquer sistema de detecção biológica que exija que as AuNPs mantenham sua identidade, como LSPR.

As propriedades óticas das AuNPs são fortemente dependentes da distância de separação interpartículas. As AuNPs são tão sensíveis, que a agregação pode ocorrer

instantaneamente ao se adicionar um analito qualquer no sistema coloidal. A agregação pode ser indicada por uma grande mudança no espectro de extinção, e se manifesta visualmente, por exemplo, como uma mudança de cor de vermelho para roxo em suspensões de nanoesferas de ouro (AuNEs) (AILI *et al.*, 2009). Essa mudança também pode ser acompanhada por espectroscopia no UV-VIS, com o deslocamento ou desaparecimento (no caso de precipitação da AuNEs) da banda de absorção característica do coloide ou, em muitos casos, o aparecimento de um ombro em maiores comprimentos de onda.

A instabilidade dos sistemas coloidais ocorre principalmente quando é introduzida na solução alguma molécula que interaja com a superfície metálica das AuNEs, sendo necessário o controle e acompanhamento dessa agregação para obter resultados confiáveis. Uma alternativa para aumentar a estabilidade é a funcionalização das AuNEs com modificadores adequados. Cada vez mais se vêm desenvolvendo estudos para a funcionalização de AuNPs com o intuito de aumentar a estabilidade destas em solução, para posterior utilização em diversas aplicações, tais como carreadores de drogas ou detecções de moléculas biologicamente relevantes (BORGHEI *et al.*, 2016; DOYEN *et al.*, 2016; VEISEH; GUNN; ZHANG, 2010).

No presente trabalho, AuNEs foram sintetizadas por método *bottom-up*, que se trata da redução química dos íons metálicos presentes em solução (CHADHA *et al.*, 2015), sendo que o agente de redução foi o citrato de sódio (FRENS, 1973). Já foi relatado em literatura (CHANANA; LIZ-MARZÁN, 2012) que o citrato de sódio forma uma camada negativa sobre a superfície das AuNEs que são recobertas por camadas de ânions dihidrogenocitrato (DOYEN *et al.*, 2016), que faz parte do chamado revestimento monométrico para AuNPs (CHANANA; LIZ-MARZÁN, 2012).

É conhecido que o material de revestimento das AuNPs durante o processo de redução, pode desempenhar papel principal no ajuste do tamanho, morfologia, estabilidade coloidal e até mesmo afetar a banda LSPR, influenciando então em suas propriedades óticas, químicas e físicas (CHANANA; LIZ-MARZÁN, 2012). É de fundamental importância, portanto, a escolha do material de revestimento, pois ele pode designar as aplicações finais do coloide.

Com a necessidade de funcionalização das AuNEs para posterior aplicação em detecção biológica, este trabalho busca utilizar a quitosana (Quit), um biopolímero natural de cadeias moleculares longas, que pode ser utilizado para a síntese de AuNPs (POTARA; GABUDEAN; ASTILEAN, 2011) como agente redutor, mas também para recobrimento após a síntese de NPs (COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; DOYEN *et al.*, 2016).

A Quit apresenta muitos grupos amino, que ficam parcialmente protonados quando em meio levemente ácido; e podem interagir com a superfície das AuNEs. Com a ligação desses grupos às AuNEs pode ocorrer uma leve agregação e formação de alguns *hot spots* (regiões com um alto campo eletromagnético local que proporciona uma intensificação do sinal SERS) controlados entre as AuNEs interligadas (CHEN *et al.*, 2015; POTARA *et al.*, 2012). O revestimento de AuNEs por cadeias poliméricas utilizadas em síntese ou pós-síntese, não só pode aumentar a sua estabilidade, mas também conferir outras propriedades e funcionalidades, como por exemplo a mudança na carga superficial das AuNEs, que são características da natureza do polímero (CHANANA; LIZ-MARZÁN, 2012; GAMBINOSSI; MYLON; FERRI, 2015).

O desenvolvimento de uma técnica rápida e eficiente para diagnóstico de doenças é de extrema importância, visto que hoje os diagnósticos se baseiam em uma triagem inicial com posterior solicitação de exames médicos, que podem apresentar uma demora no resultado e impossibilitar a rapidez no diagnóstico (CHENE *et al.*, 2012). Além de apresentarem um alto custo, a maioria das técnicas atuais é invasiva, não apresentam rápido diagnóstico, de modo que podem sofrer interferências de outros fatores e não darem resultados exatos (MATTHEWS *et al.*, 2011). Diante disso, o diagnóstico baseado em técnicas espectroscópicas, como SERS e LSPR, têm tido muita atenção recentemente, com o surgimento de novos biossensores e biomarcadores que podem oferecer diagnósticos em tempo real (BROLO, 2012), como na detecção e diagnóstico de câncer (MATTHEWS *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2016).

A técnica para a fabricação de biossensores baseada no efeito SERS para o estudo de moléculas em superfícies metálicas pode ser considerada muito sensível, por abranger a gama de comprimento de onda do visível até o infravermelho próximo com capacidade para detectar concentrações da ordem de nanomol por litro de diversos analitos (ANDRADE *et al.*, 2012; BROLO *et al.*, 2005; RODRIGUES; ANDRADE; TEMPERINI, 2013), se tornando promissora para a construção de biossensores (ANKER *et al.*, 2008; BROLO, 2012).

Utilizando como protetor superficial das AuNEs a Quit, pretende-se neste trabalho oferecer uma maior estabilidade às AuNEs para posteriores aplicações e modificações superficiais com fins de detecções específicas de espécies biológicas. Realizou-se vários experimentos com o objetivo de observar a proteção superficial dada pela Quit às AuNEs, com relação ao tempo de exposição, frente a diferentes corantes aniônicos e catiônicos: cristal violeta (CV); IR-820; e Rodamina 6G (R6G) e aos agentes agregantes etanol (EtOH) e KCl.

Os estudos foram realizados observando o deslocamento da banda de extinção característica das AuNEs em 530 nm, e a variação da intensidade do sinal SERS dos corantes em estudo.

Nos testes, foi comparada a intensidade do sinal SERS das AuNEs quando se encontravam protegidas com as que não estavam protegidas por diferentes concentrações de Quit (0,001; 0,01; 0,1 ou 1,0 g L⁻¹). Visto a possibilidade de uma maior estabilidade das AuNEs na presença de Quit, foi possível construir isotermas de adsorção para os corantes CV e IR-820, o que possibilitou obter um maior controle das moléculas adsorvidas em superfície das AuNEs pela modulação e controle na formação de *hot spots*. Tal fato torna promissora a técnica de espectroscopia Raman utilizando o efeito SERS para aplicações analíticas possibilitando o estudo de equilíbrios de adsorção de diferentes analitos com possível construção e ajustes de isotermas.

1.1 MATERIAIS PLASMÔNICOS

O interesse nos materiais plasmônicos surge com o avanço no controle de formas e tamanhos em diferentes sínteses e caracterização de nanoestruturas metálicas; com a possibilidade de aplicações específicas em diversas áreas, como física, química e biologia. Entre as possíveis aplicações, podem ser citados os exemplos da construção de células solares e de sensores para detecções de moléculas biológicas (BARNES; DEREUX; EBBESEN, 2003; LERU; ETCHEGOIN, 2009).

Os materiais plasmônicos são caracterizados principalmente por conterem metais de cunhagem como Au, Ag e Cu, que apresentam propriedades óticas únicas, tais como a alta refletividade ótica e alta condutividade, devido à presença de elétrons livres na superfície metálica, em um fundo fixo de íons positivos, que garante a neutralidade do material (LERU; ETCHEGOIN, 2009). Estes elétrons livres na superfície do metal apresentam uma frequência natural característica denominada *plasma*. Quando na presença de um campo elétrico adequado (pode ser por uma fonte de luz) ocorre a excitação coletiva desses elétrons, denominada de plasmon de superfície (SP, do inglês *Surface Plasmon*) (BARNES; DEREUX; EBBESEN, 2003; LERU; ETCHEGOIN, 2009).

O plasmon de superfície pode se propagar ao longo da superfície do metal de duas maneiras: em estruturas planares ou em nanoestruturas que apresentam formas e tamanhos diferentes, como as NPs esféricas. Quando a propagação do plasmon de superfície acontece em uma superfície plana, denomina-se propagação por plasmon-polariton de superfície (SPP, do inglês, *surface plasmon-polaritons*). Os modos SPP associados a uma interface planar são

estendidos por natureza e podem se propagar, normalmente ao longo de algumas dezenas de micrômetros (MURRAY; BARNES, 2007). Já quando o plasmon de superfície se propaga em NPs coloidais com diferentes formas, temos a ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonances*), que será o modo de propagação em foco neste trabalho, e aprofundado no tópico 1.2.

1.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E SUAS PROPRIEDADES ÓTICAS

A grande versatilidade de aplicações das NPs metálicas está relacionada com a propriedade de LSPR que estas apresentam: capacidade de interagir com a luz no visível ou no infravermelho próximo, levando à absorção de fótons (LE RU *et al.*, 2007; SENGANI; GRUMEZESCU; RAJESWARI, 2017). Esta propriedade faz com que as NPs apresentem um comportamento diferente dos materiais em macro escala, e também do seu componente metálico observado em seu estado atômico (SENGANI; GRUMEZESCU; RAJESWARI, 2017; ZHAO; LI; ASTRUC, 2013).

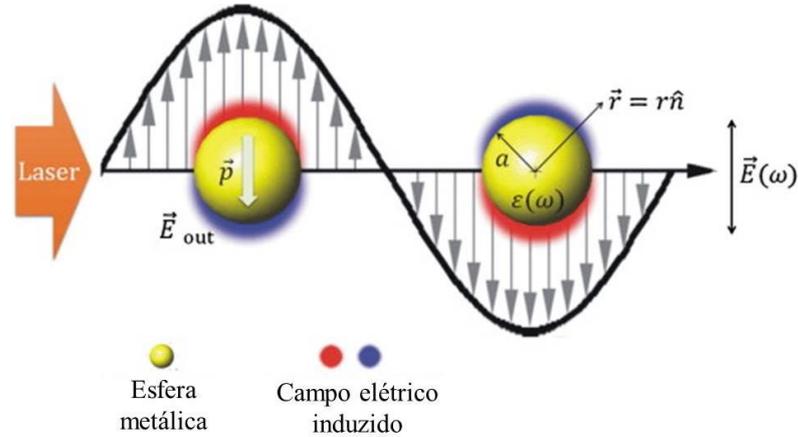
As NPs metálicas, especificamente as AuNPs, são exploradas para várias aplicações em nanotecnologia, que vai desde aplicações biomédicas, como exemplo, carreadores de medicamentos e biossensores (ARORA *et al.*, 2011; TRIPATHI; SHRIVASTAV; SHRIVASTAV, 2015), até mesmo em aplicações ambientais, como catalisadores para remoção de poluentes (KUMAR; ANTHONY, 2014; SANTOS, 2016).

A solução analítica encontrada para definir e estudar as propriedades óticas das AuNPs especificamente as AuNEs, veio através dos estudos de Mie, que no início do século XX, na curiosidade de tentar entender a coloração de uma amostra de água que continha pequenas partículas de ouro, propôs uma teoria que descreve o espectro de extinção (absorção mais espalhamento) para partículas esféricas (MAYER; HAFNER; ANTIGEN, 2011).

Na Figura 1, temos a representação esquemática da banda LSPR de NPs metálicas esféricas. No desenvolvimento da teoria de Mie é necessário que as AuNEs, de raio a , sejam muito menores que o comprimento de onda da luz incidente, com frequência angular ω e amplitude E . O contato das AuNEs de raio a , com um campo elétrico propagante de comprimento de onda λ , assumido que o raio a é muito menor que o comprimento de onda da irradiação incidente ($a \ll \lambda$), provoca a oscilação coletiva dos elétrons de condução na direção oposta ao vetor campo elétrico da radiação eletromagnética incidente (CHEN *et al.*, 2014). A oscilação coletiva, ao se propagar nas estruturas metálicas apresenta uma frequência que está

diretamente ligada ao tamanho e forma das NPs (AROCA, 2006; WILLETS; VAN DUYNÉ, 2007).

Figura 1 – Representação esquemática da LSPR em esfera metálica.



Fonte: Adaptado de (CHEN *et al.*, 2014)

Através da teoria de Mie, que utiliza as equações de Maxwell, foi possível compreender a resposta ótica das AuNEs quando submetidas a um campo eletromagnético, onde o momento de dipolo induzido na superfície da nanoesfera pode ser expresso pela Equação 1.

$$\vec{p} = \epsilon_m \alpha \vec{E}$$

Equação 1

É possível observar pela Equação 1 que o momento de dipolo induzido é proporcional à constante dielétrica do meio circundante, assim como à intensidade do campo elétrico incidente, e à polarizabilidade da esfera metálica. Esta polarizabilidade pode ser obtida considerando o modelo de Drude e aproximações eletrostáticas, sendo representada pela Equação 2.

$$\alpha = 4\pi\epsilon_0 a^3 \left(\frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m} \right)$$

Equação 2

Onde ϵ_0 e $\epsilon(\omega)$ representa a permissividade elétrica no vácuo e do metal, respectivamente. Quando o denominador da Equação 2, $\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m$, tende a zero, temos

como resultado a polarizabilidade máxima ($\alpha \rightarrow \infty$), e como consequência a banda LSPR será máxima.

A função dielétrica do metal é diretamente dependente da frequência natural de oscilação do plasma de superfície, expressa por uma função complexa da frequência, que contém uma componente real ($\varepsilon(\omega)_{real}$) e outra imaginária ($\varepsilon(\omega)_{im}$), Equação 3.

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{1 + i\gamma\omega} = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$$

Equação 3

Na Equação 3 tem-se que o termo ω_p é a frequência do plasma e γ é a constante de amortecimento do metal *bulk*, dependente da natureza do material (MAYER; HAFNER; ANTIGEN, 2011). Para que o material seja um bom substrato SERS, a parte real da função dielétrica deve ser negativa, e a parte imaginária apresentar um valor pequeno (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Para conseguir uma grande intensificação do campo elétrico local e atingir a condição máxima de ressonância entre o plasmon e o laser é necessário que $\varepsilon(\omega)_{real} = -2\varepsilon_m$ e $\varepsilon(\omega)_{im} \approx 0$ (CHEN *et al.*, 2014).

Para que ocorra a condição de ressonância $\varepsilon(\omega) \approx -2\varepsilon_m$ e, utilizando dessa condição pode-se calcular a ressonância máxima ω_{max} através da Equação 4.

$$\omega_{max} = \frac{\omega_p}{\sqrt{2\varepsilon_m + 1}}$$

Equação 4

Onde ω_{max} é a frequência da banda LSPR, que pode ser convertida de frequência para λ através da relação $\lambda = 2\pi c/\omega$. Tem-se que a relação entre a constante dielétrica e o índice de refração é dado por $\varepsilon_m = n^2$. Substituindo estas duas relações na expressão anterior temos uma equação que relaciona o comprimento de onda da banda LSPR (λ_{max}) com o material da nanoestrutura metálica (λ_p) e o índice de refração do meio circundante (n_m), dada na Equação 5 (MAYER; HAFNER; ANTIGEN, 2011).

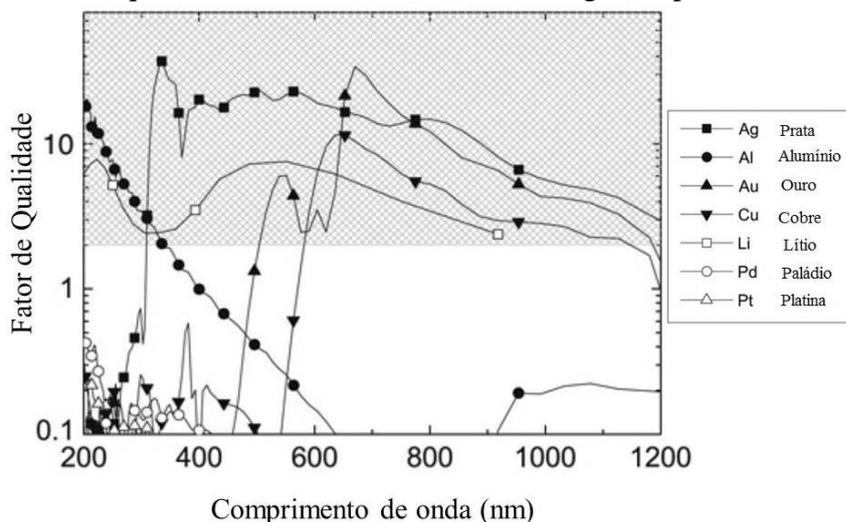
$$\lambda_{max} = \lambda_p \sqrt{2n_m^2 + 1}$$

Equação 5

Ainda sobre a parte real e imaginária da função dielétrica, é importante notar que os metais de cunhagem são considerados promissores para a observação do efeito SERS. Para

avaliar o desempenho desses metais para diferentes excitações, pode-se levar em consideração o cálculo do fator de qualidade SERS, que relaciona determinado metal com a região espectral mais adequada para a obtenção do espectro SERS. O valor do fator de qualidade para diferentes metais é apresentado na Figura 2, em faixa espectral de 200 a 1200 nm (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

Figura 2 – Fator de qualidade de diferentes metais na região espectral: 200 a 1200 nm.



Fonte: Adaptado de (LE RU; ETCHEGOIN, 2009)

Pode-se, além disso, fazer uma aproximação linear entre a banda LSPR e o índice de refração do meio, o que permite prever a utilização desse fenômeno para sensoriamento baseado na variação do índice de refração ao redor de nanoestruturas plasmônicas.

1.3 NANOESFERAS DE OURO: SÍNTESE E APLICAÇÃO

Dentre os vários trabalhos existentes na literatura com nanoestruturas metálicas, destacam-se os estudos com as AuNEs, devido estas apresentarem uma menor toxicidade (SENGANI; GRUMEZESCU; RAJESWARI, 2017; TRIPATHI; SHRIVASTAV; SHRIVASTAV, 2015). A baixa toxicidade aumenta o seu potencial para diversas aplicações em nanociência, dentre as mais variadas áreas, tais como cosméticos, catálise, diagnóstico de doenças e transporte de fármacos (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; TRIPATHI; SHRIVASTAV; SHRIVASTAV, 2015).

Kumar e Anthony, 2014, investigaram o potencial das AuNEs como um sensor colorimétrico seletivo para a cisteína em diferentes faixas de pH, e na presença de diferentes

materiais de recobrimento superficial das AuNEs (KUMAR; ANTHONY, 2014). Medley *et al.* também realizaram ensaios colorimétricos utilizando AuNEs para analisar a detecção de células cancerígenas, apresentando uma excelente sensibilidade baseado em medidas de absorvância (MEDLEY *et al.*, 2008). Já nos trabalhos de Wei *et al.*, as AuNEs foram funcionalizadas superficialmente para a detecção do vírus influenza (WEI *et al.*, 2014).

As AuNEs podem ser preparadas por duas abordagens diferentes: *top-down* ou *bottom-up*. No primeiro, ocorre a redução íon ouro para dar origem a AuNPs com dimensões desejadas, e apresenta limitações no que diz respeito ao controle do tamanho, formato e funcionalização das AuNPs (ZHAO; LI; ASTRUC, 2013). Já no método *bottom-up*, a formação das AuNPs vem de moléculas individuais proveniente de redução química ou biológica, que envolve duas etapas: nucleação e crescimento. Quando a nucleação e crescimento ocorrem simultaneamente em um mesmo processo, a síntese é caracterizada como *síntese in situ*, e se ocorrem em processos separados, caracteriza-se como síntese por método de crescimento de sementes – *seed* (FRENS, 1973; NIKOOLBAKHT; EL-SAYED, 2003; ZHAO; LI; ASTRUC, 2013).

A síntese de AuNEs mais conhecida na literatura, e que apresenta uma importante abordagem devido à simplicidade experimental, é a síntese de Frens (FRENS, 1973). Ela teve início com Turkevich *et al.* em 1951, que propôs uma metodologia em que utilizava a redução do ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) via citrato de sódio (DAVIS *et al.*, 2008; TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Foi aprimorada por Frens em 1973, que conseguiu sintetizar as AuNEs com controle de tamanho pela variação na concentração de citrato, sendo que o tamanho apresentou uma relação inversamente proporcional à concentração deste (FRENS, 1973).

As AuNEs sintetizadas de acordo com a síntese de Frens 1973, são caracterizadas como *síntese in situ*, que ocorre por redução química, em que o citrato de sódio funciona ao mesmo tempo como um agente redutor e estabilizador. O processo geral dessa síntese tem como base o aquecimento até a ebulição de um solução de HAuCl_4 , momento em que é adicionado certa quantidade de citrato trissódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); após 5 min, uma suspensão coloidal de cor avermelhada é obtida (FRENS, 1973; ZHAO; LI; ASTRUC, 2013), como demonstrado na Figura 3. O tamanho médio das AuNEs obtidas está relacionado com a razão citrato/sal de ouro em solução, podendo variar de (15 a 150 nm). As AuNEs utilizadas nesta tese são da ordem de 40 nm, e o procedimento detalhado com as concentrações dos componentes utilizados será descrito na parte experimental.

Figura 3 – Representação esquemática do processo de síntese de AuNEs segundo (FRENS, 1973).



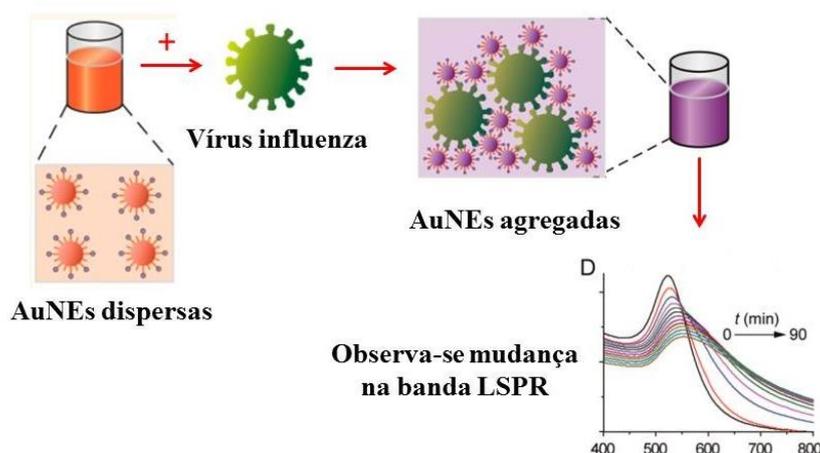
Fonte: Elaborado pela própria autora

1.4 ESTABILIDADE DAS NANOESFERAS DE OURO: AGREGAÇÃO versus PRECIPITAÇÃO

As AuNEs têm como estabilizante o citrato, considerado um bom estabilizante (ZHAO; LI; ASTRUC, 2013), mas que tem diversas limitações. As AuNEs podem agregar naturalmente com o tempo, ou a agregação pode ser ocasionada pela inserção na suspensão coloidal de uma pequena quantidade de analito que, ao adsorver na superfície metálica das AuNEs pode modificar a estabilidade dada pelas interações eletrostáticas da camada de citrato. A variação morfológica pode ser apenas agregação ou pode chegar à precipitação do material da suspensão coloidal. A diferença entre agregação e precipitação está no fato de que as AuNEs podem com uma maior intensidade, levar a desestabilização total das interações eletrostáticas, ocorrendo a precipitação direta das AuNEs, que se depositam no fundo do recipiente em que se encontram, separando da fase líquida, e descaracterizando totalmente a banda LSPR.

Como exemplo de agregação que não leva à precipitação pode-se citar os estudos de Wei *et al.*, esquematizado na Figura 4, em que foi adicionado na suspensão coloidal de AuNEs, uma pequena concentração de solução contendo o vírus influenza e ocorreu uma mudança na coloração da suspensão coloidal de vermelho para roxo, confirmada a agregação por medida de espectroscopia no UV-VIS pela mudança na banda LSPR característica do coloide (WEI *et al.*, 2014).

Figura 4 – Representação da agregação de AuNEs na presença de um analito.



Fonte: Adaptado de (WEI *et al.*, 2014)

Quando as AuNEs interagem fortemente entre si, pode ocorrer agregação, que leva a um aumento significativo na intensificação do campo eletromagnético local na mínima região que separa as AuNEs que sofreram agregação, devido ao acoplamento do plasmon das NPs que compõem o agregado. Essas regiões são denominadas de *hot spots*, e são regiões onde a intensificação do campo elétrico podem chegar de 4–5 ordens de magnitude (LERU; ETCHEGOIN, 2009).

A presença de *hot spots* pode influenciar em medidas espectroscópicas, como por exemplo, na intensificação do sinal SERS de até 10 ordens de magnitude (AROCA, 2006; LERU; ETCHEGOIN, 2009). Esta intensificação ocorre porque as moléculas do analito, ao serem adicionadas na suspensão coloidal podem adsorver nessas regiões entre as partículas, e o acoplamento entre os plasmon de superfície intensificar ainda mais o campo elétrico nessa região, fazendo com que a intensidade do sinal SERS seja muito maior, quando comparada com a intensidade de moléculas que estiverem fora dessas regiões (LERU; ETCHEGOIN, 2009).

A importância da agregação das AuNEs está ligada diretamente à presença dos *hot spots*, o que pode refletir na intensidade do sinal SERS do analito. Para exemplificar podemos descrever duas situações: Na primeira, temos uma concentração muito baixa do analito em solução e, para obter o sinal SERS deste analito, podemos agregar o coloide com agentes agregantes, ou então, em algumas situações a adição do próprio analito pode fazer com que ocorra a agregação necessária para a obtenção do espectro SERS com alta intensidade. Esse experimento pode confirmar a presença do analito na amostra, e permitir seu estudo espectroscópico detalhado, pois algumas moléculas adsorvem na região de *hot spots*.

Em outra situação, pode ocorrer a agregação descontrolada e não desejada pela adição do analito na solução coloidal ou mesmo pelo agente agregante. Esse fator pode fornecer um valor da intensidade do sinal SERS que não se reproduz, o que dificulta utilizar a técnica de espectroscopia SERS (discutida mais a diante) para realizar estudos de adsorção. Em uma situação como essa, não é possível fazer uma relação direta reprodutível entre a intensidade do sinal SERS com a concentração do analito em solução. Essa instabilidade é que abre vertentes para estudos que visem controlar o processo de agregação das AuNEs, através da modulação na formação de *hot spots*.

O controle na agregação das AuNEs e formação dos *hot spots* podem ser realizadas pela proteção superficial das AuNEs por moléculas específicas que aumentam a estabilidade destas frente a diferentes analitos; como exemplo, podemos citar a Quit, que será utilizada neste trabalho.

1.5 PROTEÇÃO SUPERFICIAL DE NANOESFERAS DE OURO

As AuNEs estabilizadas por citrato apresentam grande sensibilidade com relação a mudança de pH e força iônica do solvente, exibindo uma grande dependência das propriedades óticas com a agregação (CHANANA; LIZ-MARZÁN, 2012). O controle na agregação das AuNEs é importante, e para este fim, vem-se utilizando de diversos materiais para recobrimento superficial (CHEN *et al.*, 2015; GAMBINOSSI; MYLON; FERRI, 2015; JIANG *et al.*, 2013).

No entanto, o material de revestimento pode desempenhar um papel importante no ajuste do tamanho, morfologia, comprimento de onda de ressonância plasmônica, estabilidade e carga superficial coloidal, podendo se tornar um fator limitante para diversos campos, em particular na estabilidade coloidal e biocompatibilidade (CHANANA; LIZ-MARZÁN, 2012).

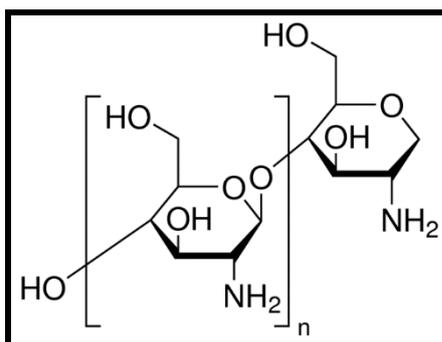
A funcionalização e proteção superficial por polímeros, vem atraindo um grande número de estudos, por estes aumentarem significativamente a estabilidade das AuNEs, sendo que a interação superficial pode ocorrer física ou covalentemente, dependendo da estrutura do grupo funcional (CHANANA; LIZ-MARZÁN, 2012; JIANG *et al.*, 2013). No processo de adsorção física, as interações entre o polímero e a superfície de ouro são relativamente fracas, e o polímero pode envolver a partícula ou adsorver de maneira irregular na superfície da partícula, dependendo do tamanho das partículas, do comprimento da cadeia (e estrutura) do polímero e do solvente (CHANANA; LIZ-MARZÁN, 2012; LIU *et al.*, 2010). Neste trabalho será utilizado como material de recobrimento e proteção superficial de AuNEs o biopolímero

Quit, que se apresenta muito promissor dentre os materiais de revestimento, principalmente em aplicações biológicas, devido à sua biocompatibilidade.

1.6 O BIOPOLÍMERO QUITOSANA

A Quit, cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 5, é um heteropolissacarídeo obtido pela desacetilação química superior a 50 % da quitina: Um biopolímero bastante abundante na natureza, encontrado principalmente em carapaças de crustáceos (BARROS *et al.*, 2006; BEZERRA, 2011; COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015). É considerada biocompatível, biodegradável e atóxica, constituída, predominantemente, por várias unidades D-glicosamina e por unidades N-acetil-D-glicosamina ligadas por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ (BEZERRA, 2011).

Figura 5 – Fórmula molecular estrutural do biopolímero quitosana.



Fonte: Sigmaaldrich.com/brazil.html

Quando em solução aquosa neutra, a Quit é insolúvel; a solubilização acontece quando sua estrutura apresenta carga positiva devido à protonação dos grupos amino (NH₂) e hidroxila (OH) pertencentes à sua estrutura. Como o seu pK_a está em torno de 6,3, a Quit se torna solúvel em ácidos orgânicos diluídos (COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; GARABAGIU; PESTEAN; STEFAN, 2013). Uma solução de ácido acético 1 % já é considerado o suficiente para que ocorra a sua solubilização, mas geralmente nem todos os grupos aminos são protonados.

A Quit é considerada um polímero versátil pela sua aplicação em diversas áreas industriais (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009; FILGUEIRAS, 2013), que incluem a aplicação na adsorção e remoção de íons metálicos (LAUS *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007), corantes (PRADO *et al.*, 2004), atividade antimicrobiana associada com NPs de Ag (LOU *et al.*, 2014) e carreadores de fármacos (FILGUEIRAS, 2017).

A forte interação com o Au pela presença dos grupos aminos na estrutura da Quit, a torna eficaz como agente estabilizante de suspensões coloidais metálicas, além de diminuir a toxicidade do metal, tal que pode ser considerado um bom material de revestimento de NPs metálicas que apresentam carga superficial negativa, como as AuNEs utilizadas neste estudo (COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; FILGUEIRAS, 2013). Mais informações sobre a interação da Quit com AuNEs serão discutidas no item 1.6.1.

1.6.1 Quitosana como um protetor superficial em nanopartículas metálicas

A Quit apresenta uma grande capacidade de interagir com diversos materiais, como exemplo: proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos, dentre outros (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009; FILGUEIRAS, 2013).

As AuNEs sintetizadas e estabilizadas por citrato apresentam carga superficial negativa, porque o excesso de citrato presente após a síntese é adsorvido na superfície das AuNEs, o que causa repulsão eletrostática suficiente para impedir que as AuNEs se agreguem (SUGUNAN *et al.*, 2005). Por outro lado, a Quit apresenta carga positiva em solução aquosa levemente ácida, devido à protonação dos grupos amino. Os grupos protonados da Quit formam sítios ativos que se ligam à superfície negativa das AuNEs por interação eletrostática, formando emaranhados ao redor das AuNEs, alterando a carga superficial e aumentando a estabilidade em relação à agregação (COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; FILGUEIRAS, 2017; SUGUNAN *et al.*, 2005).

A Quit pode ser utilizada tanto no processo de síntese das NPs metálicas ou adicionada depois das NPs metálicas sintetizadas. Em ambos os casos foi reportado o aumento da estabilidade das NPs metálicas (COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; FILGUEIRAS, 2013, 2017). O presente estudo propôs a utilização da Quit inserida após a síntese das AuNEs estabilizadas por citrato, como forma de controlar a estabilidade das AuNEs na presença de agentes agregantes e corantes. Este estudo ajudará a determinar se a Quit pode ser utilizada como um modulador da formação de *hot spots* entre as AuNEs, para posterior aplicação em estudos de equilíbrio de adsorção por espectroscopia SERS.

1.7 A ESPECTROSCOPIA RAMAN E O EFEITO SERS

Neste trabalho será utilizado o efeito Raman intensificado por superfície, mais conhecido pela sigla SERS (do inglês *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*), para acompanhar a adsorção de corantes em AuNEs protegidas superficialmente por Quit. O efeito

SERS surge da utilização de nanoestruturas metálicas para obtenção da intensificação do espalhamento Raman do analito em estudo adsorvido nessas nanoestruturas. Para dar início ao estudo do efeito SERS, faz-se necessário compreender alguns fundamentos da técnica de espectroscopia Raman.

No início do século XIX já se havia descoberto a técnica de espectroscopia no infravermelho, e observado a relação dessa radiação com os grupos de átomos na molécula, sendo que em 1900 já se haviam caracterizados vários compostos orgânicos por essa técnica, pela obtenção de espectros vibracionais e atribuição de modos vibracionais (BARBOSA, 2007; SALA, 2008).

Em busca por maiores informações estruturais dos compostos orgânicos, existia um grande empenho em estudos que envolviam a possibilidade de melhoramento e desenvolvimento de técnicas para caracterização de materiais, como a obtenção de espectros vibracionais. Em 1928 o físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman, em seus experimentos sobre o espalhamento da luz, descobriu um novo fenômeno que poderia também ser utilizada para a caracterização de compostos, recebendo o nome, em sua homenagem, de *Espectroscopia Raman* (RAMAN; KRISHNAN, 1928).

A espectroscopia Raman, assim como a espectroscopia no infravermelho, também oferece informações sobre as transições vibracionais da molécula. Ela permite, através da análise do padrão das bandas, caracterizar o composto de acordo com a frequência, largura e intensidade das bandas. Essas informações, portanto, permitem relacionar as informações espectrais obtidas diretamente com a estrutura molecular do composto (CARVALHO, 2012; SANT'ANA, 2005).

A teoria Raman tem como base a irradiação de uma amostra por uma fonte de radiação monocromática, em que um fóton de energia $h\nu_0$ ao encontrar a molécula em seu estado eletrônico e vibracional fundamental, produz uma perturbação levando-a para um estado virtual. Esse estado virtual é instável por não ser um estado próprio da molécula, e a molécula decai muito rapidamente ao seu estado eletrônico inicial; nesse momento, a luz é espalhada inelasticamente na forma de um fóton de energia $(h\nu_0 - e_v)$ ou $(h\nu_0 + e_v)$, que pode ser medido por um detector. A diferença entre a frequência da radiação incidente e a radiação espalhada está relacionada com as transições vibracionais do composto, sendo e_v a diferença de energia entre dois estados vibracionais (LERU; ETCHEGOIN, 2009; SALA, 2008).

Na técnica de absorção no infravermelho é necessário ocorrer à variação do momento de dipolo elétrico intrínseco da molécula durante a vibração molecular para ocorrer absorção de um fóton de energia. Na espectroscopia Raman tem-se que levar em consideração o

momento de dipolo induzido na molécula, criado pelo campo elétrico proveniente da radiação monocromática incidente e como ele varia com a vibração molecular. O momento de dipolo induzido é dado na Equação 6:

$$\vec{P} = \alpha \vec{E}$$

Equação 6

Onde: α é o tensor de polarizabilidade, que relaciona os componentes dos dois vetores momento de dipolo induzido (P) e campo elétrico (E). Simplificadamente pode-se dizer que α é a medida da deformação da nuvem eletrônica na presença de um campo elétrico incidente.

Através das definições matemáticas do vetor campo elétrico E , polarizabilidade α , relações trigonométricas e rearranjos necessários (SALA, 2008), o momento de dipolo induzido pode ser escrito de acordo com a Equação 7.

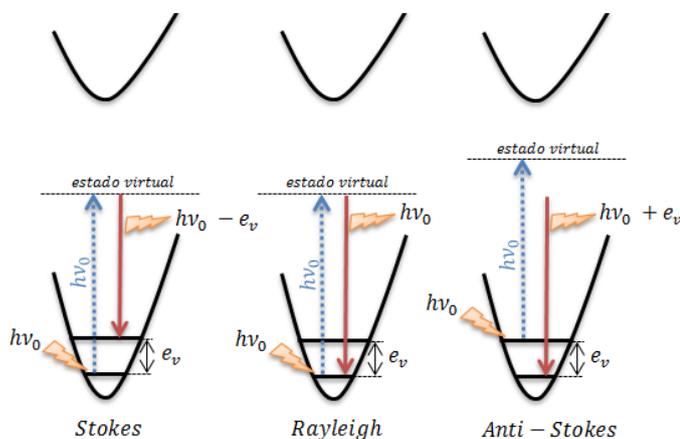
$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \sum_k \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 Q_{k0} \vec{E}_0 [\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_k)t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_k)t]$$

Equação 7

Na Equação 7 observamos que para o momento de dipolo induzido temos a contribuição de três espalhamentos diferentes com frequências ν_0 , $(\nu_0 + \nu_k)$ e $(\nu_0 - \nu_k)$. Estas frequências são características dos dois mecanismos de espalhamento existentes: espalhamento elástico e espalhamento inelástico.

Pode-se observar que no primeiro termo da equação temos somente a contribuição no espalhamento da frequência relacionada à radiação monocromática incidente ν_0 , ou seja, não envolve as frequências características da molécula; esse é o termo de espalhamento elástico, denominado de espalhamento Rayleigh. No segundo e terceiro termo da Equação 7 tem-se a contribuição do espalhamento inelástico, conhecido como espalhamento Raman, subdividido em Stokes $(\nu_0 - \nu_k)$ e Anti-Stokes $(\nu_0 + \nu_k)$. Os três fenômenos são apresentados esquematicamente na Figura 6.

Figura 6 – Esquema dos mecanismos de espalhamento.



Fonte: (SANTOS, 2016)

A Figura 6 apresenta esquematicamente os diferentes tipos de mecanismo do fenômeno de espalhamento da luz. Após perturbação da molécula por um fóton com energia $h\nu_0$, aquela atinge um estado virtual e volta para o nível eletrônico inicial, de modo que o fóton é espalhado. Se o fóton é espalhado com menor energia que a do fóton incidente $h\nu_0$, tendo a energia de $(h\nu_0 - e_v)$ neste exemplo temos o espalhamento Stokes, em que há transferência de energia para a molécula, que é deixada no estado vibracional excitado. Já se o fóton é espalhado com mesma energia que a do fóton incidente ($h\nu_0$), quando a molécula volta ao seu estado vibracional fundamental, ocorre o espalhamento Rayleigh, sem nenhuma modificação na frequência do fóton espalhado. Já no último mecanismo de espalhamento, o fóton interage com a molécula que já se encontra em um estado vibracional excitado, ao decair para o estado eletrônico inicial vai para o estado vibracional fundamental. Neste caso, espalha um fóton com maior energia do que o fóton incidente ($h\nu_0 + e_v$), caracterizando o espalhamento anti-Stokes (SALA, 2008). A intensidade das bandas Stokes é em geral mais elevada que as bandas anti-Stokes, devido à população do estado vibracional fundamental ser maior do que do estado vibracional excitado.

O espalhamento Raman, por depender do número de espalhadores de luz, que exige o envolvimento de dois fótons (um incidente e outro espalhado), pode ser considerado um efeito relativamente fraco, apresentando uma baixa eficiência, com seção de choque entre 10^{-30} e 10^{-25} cm^2 molécula $^{-1}$, o que significa que apenas 1 em cada 10^8 fótons espalhados apresentam espalhamento Raman (SALA, 2008). Esta ineficiência no espalhamento Raman, apresenta-se como uma das principais limitações da técnica, principalmente para a obtenção de espectros de soluções, sendo necessária a presença de uma concentração muito alta do analito.

Na prática, na maioria das situações, nos deparamos com concentrações muito baixas do analito para ser identificado, necessitando de uma maior sensibilidade da técnica. Além disso, a molécula de interesse pode estar em regiões de interface, sendo necessária a caracterização nessa situação, principalmente na interface sólido-solução. Nesse contexto, tem-se a importância do efeito SERS, descoberto por Fleischmann *et al.* (FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974).

Os estudos iniciais desenvolvidos por Fleischmann *et al.* foram realizados com a obtenção do espectro SERS da molécula de piridina adsorvida em um eletrodo de prata que havia sofrido vários ciclos de oxido-redução para aumentar a sua área superficial através de rugosidades (FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974).

Dando continuidade aos estudos de Fleischmann *et al.*, em 1974, dois trabalhos independentes, de Jeanmaire e VanDuyne 1977 e Albrecht e Creighton 1977, também com estudos da adsorção da piridina em eletrodo e coloide de prata, respectivamente, verificaram que houve aumento na seção de choque para o espalhamento Raman da piridina adsorvida na ordem de 10^6 vezes (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977; JEANMAIRE; VANDUYNE, 1977). Estes estudos demonstraram que o aumento da seção de choque efetiva não estava ligado unicamente à presença de rugosidades no eletrodo de prata, mas também a um efeito de intensificação causado pela presença da superfície, que foi mais tarde chamado de efeito SERS.

Com a descoberta experimental do efeito SERS, vários estudos teóricos foram realizados na década de 1980 por pesquisadores, para entender o efeito. Utilizaram-se diferentes superfícies metálicas, tais como: eletrodos ativados, filmes finos e suspensões coloidais (FAN; ANDRADE; BROLO, 2011; FARIA; TEMPERINI; SALA, 1999). As teorias propostas a partir desses estudos, explicaram o efeito SERS com base em dois mecanismos: mecanismo químico e mecanismo eletromagnético (FARIA; TEMPERINI; SALA, 1999; LE RU; ETCHEGOIN, 2009; SHARMA, 2012), que serão descritos nos tópicos 1.7.1 e 1.7.2.

1.7.1 Mecanismo eletromagnético

O mecanismo eletromagnético parte do princípio de que a radiação incidente promove uma excitação coletiva no movimento dos elétrons na superfície metálica de nanoestruturas (LSPR), o que leva à intensificação do campo eletromagnético local nas proximidades das NPs, intensificando o sinal Raman de moléculas próximas ou adsorvidas no metal

(MOSKOVITS, 1985). Este mecanismo está diretamente ligado à natureza, forma e tamanho do metal, sendo os metais mais utilizados como substrato SERS: Au, Ag e Cu (SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006). O tamanho ideal de NPs metálicas, para obter uma maior intensificação do sinal SERS, já foi relatado na literatura como sendo da ordem de dezenas de nanômetros (AROCA, 2006). O mecanismo eletromagnético é o que contribui mais significativamente ($\sim 10^{10}$) para o fator de intensificação de espalhamento Raman (SANTOS, 2016).

Este modelo também considera que para obter o sinal SERS não é necessário que a molécula esteja em contato com a superfície metálica, admitindo-se uma adsorção física quando a molécula está muito próxima à superfície (MCNAY *et al.*, 2011; SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006). O campo elétrico local pode ser intensificado com uma dependência com E^4 . A Equação 8 relaciona a intensidade do sinal SERS $I_{SERS}(\nu_S)$ com o número de moléculas espalhadoras (N), a intensidade da radiação excitante $I(\nu_L)$, o campo elétrico da radiação excitante $E(\nu_L)$, o campo elétrico da radiação espalhada $E(\nu_S)$ e a seção de choque Raman da molécula σ_{ads}^R (AROCA, 2006; FONSECA, 2016).

$$I_{SERS}(\nu_S) = N \cdot I(\nu_L) |E(\nu_L)|^2 |E(\nu_S)|^2 \sigma_{ads}^R$$

Equação 8

1.7.2 Mecanismo químico

A observação da contribuição do mecanismo químico no sinal SERS vem de resultados experimentais onde foram observadas contribuições na intensificação de sinal que estavam além da contribuição somente do mecanismo eletromagnético. Neste mecanismo tem-se uma dependência com a estrutura eletrônica da molécula adsorvida no metal, com o qual geralmente forma um complexo de superfície, podendo ocorrer interações por transferência de carga entre os estados do metal e os estados próprios da molécula (RUBIM *et al.*, 1995). É fundamental o contato da molécula com a superfície metálica. A contribuição na intensificação segundo este modelo é da ordem de 10^2 (MCNAY *et al.*, 2011).

Devido à adsorção química entre a superfície metálica e a molécula, podemos ter a formação de uma nova espécie, e o espectro Raman intensificado por superfície pode apresentar algumas diferenças nas bandas, como mudança na posição, diferença de intensidade relativa e aumento de intensidade, comparado com o espectro Raman normal da molécula em soluções aquosas (FILGUEIRAS, 2013; FONSECA, 2016).

1.8 O PROCESSO DE ADSORÇÃO

O estudo da adsorção de macromoléculas em NPs coloidais é um tópico interessante que vem atraindo a atenção de vários autores, através de experimentos, que necessitam de muitos trabalhos experimentais para elucidar o mecanismo de adsorção em coloides (DEL PUERTO *et al.*, 2014; IZQUIERDO-LORENZO *et al.*, 2012; SÁNCHEZ-CORTÉS *et al.*, 1998). Como já discutido, a resposta do efeito SERS depende fortemente do tamanho e da distribuição das NPs metálicas (SEVILLA *et al.*, 2014), sendo que a intensidade SERS é maior quando estas nanoestruturas apresentam um tamanho de algumas dezenas de nanômetros e um espaçamento interpartículas de alguns nanômetros (BARALDI *et al.*, 2014). Com a agregação das NPs metálicas, tem-se a diminuição da distância interpartículas com a formação dos *hot spots*, que como já discutido, são regiões interpartículas que apresentam uma grande intensificação do campo eletromagnético, quando comparado com as NPs isoladas, que pode influenciar na intensificação do sinal SERS (SEVILLA *et al.*, 2014).

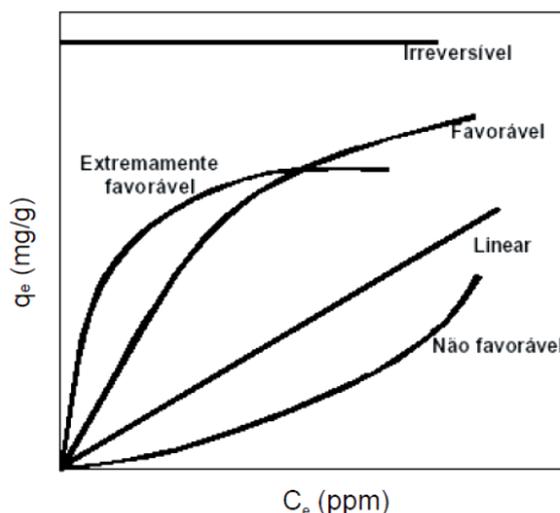
Como o controle na formação de *hot spots* não é fácil torna-se necessário encontrar condições específicas para estudar a adsorção de cada molécula (SEVILLA *et al.*, 2014) pela técnica SERS. Essa técnica apresenta uma grande desvantagem com a falta de métodos confiáveis para a obtenção de *hot spots*, que resultem em maior reprodutibilidade quando os analitos são adsorvidos à superfície das NPs. O que torna necessária a construção de substratos que ofereçam respostas reprodutíveis e otimizadas do sinal SERS, pois a intensidade do sinal depende fortemente do número de *hot spots* presentes no substrato SERS (BARALDI *et al.*, 2014). Para que o processo de adsorção em NPs metálicas possa ser realizado pela medida do sinal SERS, o controle na formação de *hot spots* é essencial; uma alternativa proposta nesse trabalho é o recobrimento ou proteção superficial.

Estudos utilizando a técnica SERS como ferramenta analítica aplicada ao estudo de equilíbrio de adsorção e construção de isotermas já vêm apresentando sucessos nas análises para a adsorção de diferentes moléculas: Del Puerto *et al.* realizaram estudos de adsorção de dois pigmentos da indústria têxtil: quinacridona (QA) e 2,9-dimetilquinacridona (2,9-DMQA) (DEL PUERTO *et al.*, 2014). Por outro lado, Sevilla *et al.* focaram no uso da técnica para a detecção de moléculas biológicas, mostrando que os agregados influenciam na intensidade do sinal SERS (SEVILLA *et al.*, 2014). Também foi estudada a adsorção de ácido cafeico (SÁNCHEZ-CORTÉS; GARCÍA-RAMOS, 1999), drogas de abuso (RIVAS *et al.*, 2001), dentre várias outras moléculas presentes na literatura.

O processo de adsorção acontece quando uma determinada quantidade de adsorvente (em nossos estudos a superfície metálica) entra em contato com determinado analito (a molécula em estudo) que pode estar presente em solução na fase líquida. O sistema entra em equilíbrio quando a quantidade de analito adsorvida é igual à quantidade desorvida (CRUZ JUNIOR, 2010; KAHLOW, 2007), condição que depende da concentração adicionada de analito. Este resultado pode ser representado graficamente e denominado de isoterma de adsorção.

As isotermas têm a finalidade de informar sobre o mecanismo de adsorção, e a sua representação pode ser de diferentes formas, apresentado na Figura 7. Como exemplo, quando se classifica uma isoterma como linear, significa que a quantidade de analito adsorvida é linearmente proporcional à concentração do analito na solução; já isotermas convexas são consideradas favoráveis, pois indicam que o material adsorve grande quantidade de analito mesmo em baixas concentrações do último em solução (CUSSLER, 1997; NUNES, 2009).

Figura 7 – Diferentes representações de isotermas de adsorção.



Fonte: (CUSSLER, 1997 apud NUNES, 2009, p.32)

Como visto anteriormente, através da análise visual da forma das isotermas, consegue-se identificar o tipo de interação entre analito e o adsorvente. Na literatura são encontrados diversos modelos matemáticos que descrevem os dados experimentais para a construção de isotermas; os mais usados são o de Langmuir e o de Freundlich (SCHNEIDER, 2008). Para os estudos de adsorção em nanoestruturas metálicas, iremos trabalhar com o ajuste da isoterma de Langmuir.

1.8.1 Isotermas de Langmuir

O modelo de Langmuir assume a hipótese da formação de uma monocamada pela forte interação do analito com a superfície metálica, sem que ocorra interação entre as moléculas de analito quando nos sítios ativos (ANDRADE *et al.*, 2012; IZQUIERDO-LORENZO; SANCHEZ-CORTES; GARCIA-RAMOS, 2010; KLEINMAN *et al.*, 2011). Em trabalhos anteriores foi demonstrado para experimentos SERS que o modelo de Langmuir, expresso pela Equação 9, pode ser aplicado em experimentos que usam a técnica SERS como forma de determinar a adsorção em função da concentração de analito.

$$I_s = \frac{K_{ad} I_{sm} [A]}{1 + K_{ad} [A]}$$

Equação 9

Onde I_s é a intensidade relativa SERS do analito na concentração $[A]$; K_{ad} é a constante de adsorção do corante na superfície do metal, I_{sm} é a intensidade relativa SERS na condição de saturação, como exemplo, a máxima cobertura da superfície (IZQUIERDO-LORENZO *et al.*, 2012). Esta expressão representa o ajuste ao modelo de isoterma de Langmuir, em que é plotado a intensidade SERS *versus* a concentração do analito na amostra, lembrando que a intensidade SERS é dependente do número de moléculas adsorvidas na superfície das NPs metálica. A Equação 9 linearizada dá origem à Equação 10.

$$\frac{1}{I_s} = \frac{1}{K_{ad} I_{sm}} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{I_{sm}}$$

Equação 10

A partir desta equação, verifica-se que plotando-se $1/I_s$ versus $1/[A]$ e realizando um ajuste linear, obtém-se os valores dos parâmetros de K_{ad} e I_{sm} para o analito em estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar a proteção superficial de AuNEs pelo biopolímero Quit, para verificar a possível aplicação no aumento de estabilidade destas, controlar a formação de *hot spots* e adsorção não-específica para o estudo de equilíbrio de adsorção e construção de isotermas, para possível aplicação em biossensores óticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral do trabalho foram necessários objetivos específicos, que seguem:

- a) Sintetizar e otimizar as AuNEs para a aplicação como substrato para os espectros SERS e utilização nos estudos de proteção superficial e estabilidade.
- b) Entender melhor e determinar as condições de modificação superficial dessas AuNEs pelo biopolímero Quit.
- c) Estudar e otimizar as condições de estabilidade das AuNEs quando protegidas por Quit.
- d) Estudar a interação superficial de AuNEs com corantes aniônicos e catiônicos quando estas estão protegidas superficialmente por Quit.
- e) Estudar a agregação e estabilidade das AuNEs com e sem proteção superficial pelo biopolímero Quit, frente a agentes agregantes como o KCl e etanol.
- f) Estudar a agregação das AuNEs por espectroscopia no UV-VIS pelo deslocamento LSPR ao adicionar o corante R6G em AuNEs com e sem proteção superficial.
- g) Definir a influência no sinal SERS do corante R6G na utilização de AuNEs com e sem proteção superficial pelo biopolímero Quit.
- h) Correlacionar a agregação com a formação de *hot spots* e influência na intensidade do sinal SERS.
- i) Estudar a relação intensidade do sinal SERS dos corantes: cristal violeta e IR-820, com a quantidade adsorvida em superfície das AuNEs protegidas superficialmente por Quit.
- j) Realizar o ajuste das isotermas de adsorção obtidas utilizando o modelo de Langmuir.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES

Citrato de Trissódio dihidratado (Merck; ≥ 99 %); Ácido Tetracloroáurico (Sigma Aldrich; $\geq 99,9$ %); Quitosana Médio Peso Molecular (Sigma Aldrich; Grau de Desacetilação 75- 87 %); Corante IR-820 (Sigma Aldrich); Corante Cristal Violeta (Sigma Aldrich); Corante Cloreto de Rodamina 6G (Sigma Aldrich; > 95 %); Cloreto de Potássio (Sigma Aldrich; ≥ 99 %); Etanol (Sigma Aldrich; > 95 %). As soluções foram preparadas utilizando água deionizada ($R = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Toda a vidraria foi limpa com solução de água régia (3:1; HCl:HNO₃) e posteriormente lavada com água deionizada abundantemente e, só então, seca em estufa a 100 °C para posterior reutilização.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1 UV – VIS

A técnica de espectroscopia no ultravioleta visível (UV-VIS) foi utilizada para caracterizar a síntese de AuNEs e os corantes utilizados. Foi possível acompanhar os pequenos deslocamentos no comprimento de onda da banda LSPR característica das AuNEs, devido às possíveis agregações e instabilidade das AuNEs, ao ser adicionado corantes na suspensão coloidal na presença ou ausência do biopolímero Quit. Esta técnica também possibilitou acompanhar a indução da agregação das AuNEs pelos agentes agregantes: KCl e etanol. Para estas análises, utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm, e as medidas foram realizadas em equipamento espectrofotômetro Ocean Optics USB2000, com um intervalo de comprimentos de onda de 200 a 1100 nm, detector CCD linear de silício Sony ILX511. Foram utilizados os seguintes parâmetros instrumentais: tempo de integração: 4,0 ms, realizada a média de 50 scans e alinhamento dos espectros utilizando a média da medida em determinado comprimento de onda com o ponto seguinte e anterior do espectro (denominado *boxcar* no software).

3.2.2 Espectroscopia SERS

A análise da especificidade da Quit como protetor superficial e estabilizante, o estudo da modulação da intensidade do sinal SERS da R6G, e também a construção das isotermas de adsorção, foram estudadas por espectroscopia SERS. Para a obtenção destas medidas, as amostras em solução foram levadas a um espectrômetro Raman dispersivo Bruker modelo

Senterra, com um detector CCD termoeletricamente resfriado, onde os espectros SERS foram obtidos em uma linha laser em 633 nm de um laser de He-Ne, com potência de laser 5 mW na saída do laser, usando objetiva de 50× e abertura numérica $NA = 0.5$. Os espectros SERS foram obtidos com 50 s de acumulação total.

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram feitas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das AuNEs. As amostras foram preparadas gotejando a suspensão coloidal sobre silício e secando sob vácuo. Estas análises foram realizadas no Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), na Divisão de Metrologia de Materiais, cidade de Duque de Caxias – RJ, em colaboração com o pesquisador Dr. Bráulio S. Archanjo. As imagens foram obtidas utilizando-se microscópio eletrônico de varredura, tipo Field Emission Gun (FEG-MEV), da marca FEI, modelo Magellan.

3.3 PROCEDIMENTOS

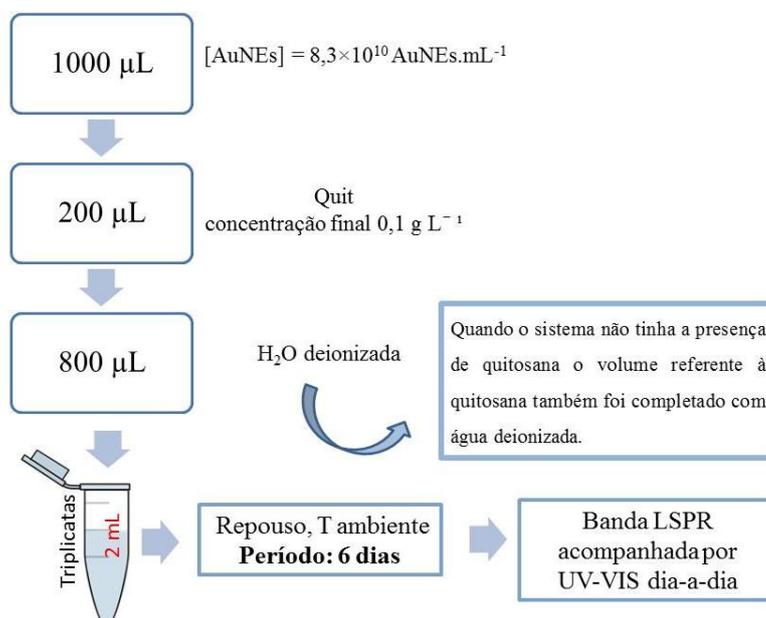
3.3.1 Síntese e caracterização das AuNEs

As AuNEs foram sintetizadas de acordo com a literatura (FRENS, 1973). De maneira breve, em um balão volumétrico de 3 vias foram adicionados 50,0 mL de H₂O deionizada e 500,0 µL de uma solução de sal de Au (HAuCl₄) 1,0×10⁻² % (m/v) ou (0,010 mol L⁻¹) (m/v). Esta solução foi levada para uma manta aquecedora e colocada em refluxo até atingir a ebulição. Nesse momento, foram adicionados 500,0 µL de uma solução de citrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) 1,0 % (m/v). Após 5 min observou-se mudança rápida na coloração de azul para vermelho, e nesse momento foi retirado o refluxo e deixado esfriar a temperatura ambiente. A formação das AuNEs é caracterizada por essa coloração avermelhada com uma banda no UV-VIS em torno de 530 nm. A concentração de AuNEs por mL também foi estimada pela medida do tamanho das AuNEs por MEV, em 8,3×10¹⁰ AuNEs·mL⁻¹. Para estimar a concentração de AuNEs em 1 mL de solução coloidal foi levado em consideração a média dos diâmetros das AuNEs através do MEV, Figura 15 (b). Posteriormente considerou-se o volume de uma esfera $V = 4\pi r^3/3$, assumindo que todo o Au adicionado na síntese reduziu para formar as AuNEs, utilizou-se do cálculo de densidade $d = m/V$ para calcular a massa de 1 AuNEs. Então, considera-se a massa total de Au em 1,0 mL de solução coloidal e estima-se a concentração de AuNEs.

3.3.2 Montagem dos experimentos para o estudo de estabilidade das AuNEs utilizando a Quit como um protetor superficial

Com o objetivo de iniciar os estudos sobre o comportamento da Quit como protetor superficial, foi estudada a estabilidade das AuNEs com e sem proteção superficial pela Quit. Para a montagem deste experimento foram adicionados em frasco tipo Eppendorf 1,0 mL de AuNEs mais 200,0 μL de Quit para uma concentração final de Quit $0,1 \text{ g L}^{-1}$ e 800 μL de H_2O deionizada, completando um volume total de 2,0 mL. As suspensões resultantes ficaram em repouso a temperatura ambiente por um período de até 6 dias. Foram realizadas medidas por espectroscopia no UV-VIS destes experimentos, com o intuito de observar e monitorar possíveis mudanças na banda de extinção LSPR característica das AuNEs. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As medidas espectroscópicas foram realizadas após a montagem dos experimentos, e dia-a-dia até o período final de 6 dias. A montagem experimental necessária para este estudo é apresentada na Figura 8.

Figura 8 – Montagem dos experimentos para o estudo de estabilidade das AuNEs utilizando a Quit como protetor superficial.



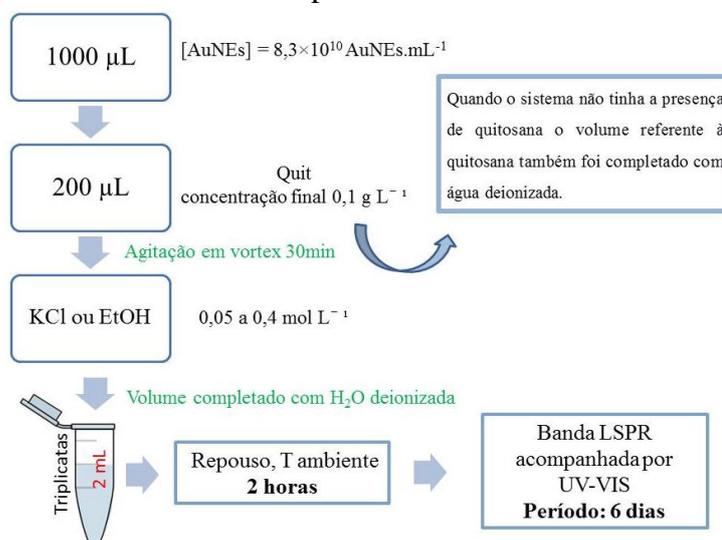
Fonte: Elaborado pela própria autora

3.3.3 Procedimento para o estudo de indução da agregação das AuNEs por KCl e EtOH

Para determinar o efeito de proteção superficial da Quit em AuNEs foi proposto um estudo da indução da agregação das AuNEs quando estas estivessem com e sem a proteção pelo biopolímero. A indução da agregação foi realizada por agentes agregantes de nanopartículas metálicas conhecidos em literatura: KCl e EtOH. Para a montagem deste experimento foram adicionados em frasco tipo Eppendorf 1,0 mL de AuNEs e a quantidade necessária do agente agregante (KCl ou EtOH) para uma concentração final que variou de 0,05 a 0,40 mol L⁻¹. O volume final em Eppendorf sempre foi ajustado com água deionizada para 2,0 mL. Quando foi utilizada no experimento a Quit para proteção superficial, a montagem do experimento seguia a seguinte ordem de adição: 1,0 mL de AuNEs, 200,0 µL de Quit (solubilizada em ácido acético 1 %) para uma concentração final de Quit de 0,1 g L⁻¹, agitação em sistema vortex por 30 min, e posterior adição do agente agregante (KCl ou EtOH) para a concentração final desejada, que também foi de 0,05 a 0,40 mol L⁻¹. O volume final também foi ajustado com água deionizada para 2,0 mL.

Após a montagem do experimento sempre foram realizadas medidas no UV-VIS das suspensões. Posteriormente, estas foram colocadas em repouso em bancada de laboratório a temperatura ambiente, e foi monitorado a banda LSPR característica das AuNEs por um período de 6 dias, sendo que a cada dia no mesmo horário e mesmas condições foram realizadas as medidas no UV-VIS. A montagem deste experimento é representada esquematicamente na Figura 9.

Figura 9 – Montagem experimental para a realização do estudo de indução da agregação das AuNEs por KCl e EtOH.



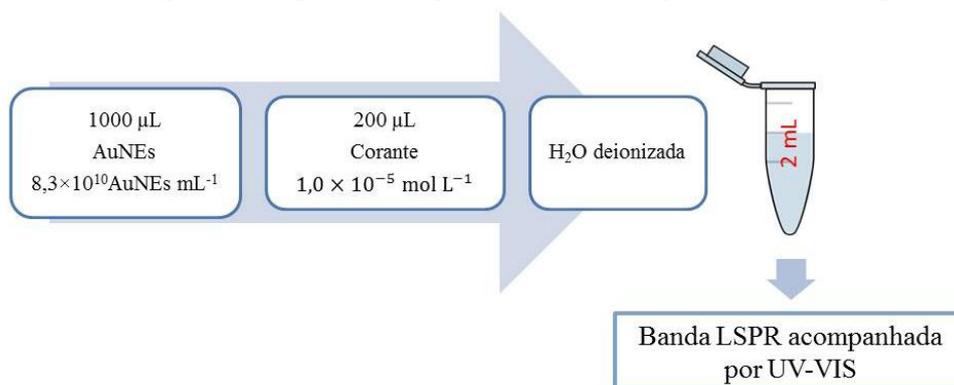
Fonte: Elaborado pela própria autora

3.3.4 Caracterização dos corantes e sua influência na banda LSPR das AuNEs

Como molécula prova para o SERS foram utilizados os corantes Rodamina 6G (R6G), Cristal Violeta (CV) e IR-820. Foi necessária a caracterização destes corantes por espectroscopia no UV-VIS para observar o seu máximo de absorção. Para esta caracterização foram preparadas soluções destes corantes em água destilada na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Para a obtenção dos espectros no UV-VIS foram utilizadas as condições já descritas acima.

Após obter o UV-VIS para a caracterização das AuNEs e das soluções dos corantes separadamente, também foram realizados experimentos para a obtenção dos espectros UV-VIS da suspensão das AuNEs na presença das soluções de corantes para uma concentração final de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para cada corante. Na montagem do experimento sempre foram adicionados 1,0 mL das AuNEs mais 200,0 µL da solução de cada corante, e água deionizada para completar o volume final de 2,0 mL, Figura 10. O objetivo foi determinar se ocorre alguma mudança no espectro UV-VIS quando as moléculas dos corantes interagem com a superfície das AuNEs, principalmente quando se tem a presença de dois corantes em solução. As medidas no UV-VIS foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Figura 10 – Montagem do experimento para a caracterização dos corantes por UV-VIS.



Fonte: Elaborado pela própria autora

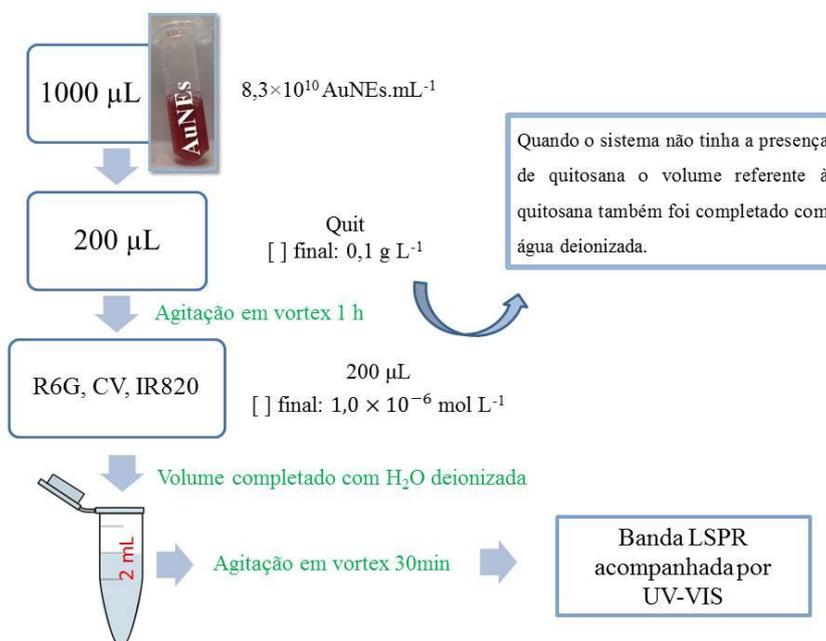
3.3.5 Interação das AuNEs com quitosana como protetor superficial e os corantes.

No experimento anterior foi realizado um estudo das AuNEs frente a dois corantes diferentes para observar a influência no plasmon de superfície característico das AuNEs sem proteção superficial pelo biopolímero Quit. Como o adsorvente na superfície da NPs pode

influenciar na banda LSPR e provocar agregação, foi proposto utilizar a Quit como um protetor superficial frente aos corantes estudados.

Para a montagem deste experimento também foi utilizado 1,0 mL da suspensão de AuNEs mais 200,0 μL de uma solução dos corantes R6G, CV ou IR-820 para uma concentração final de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, na ausência da Quit, o volume foi então completado para 2,0 mL com água deionizada. Na presença do biopolímero Quit, foi adicionado à suspensão de AuNEs, 200,0 μL da solução de Quit (solubilizada em ácido acético 1 %) para uma concentração final de $0,1 \text{ g L}^{-1}$, agitação em sistema vortex por 1 h, e posteriormente adicionado o corante, seguido da adição de água deionizada até completar o volume de 2,0 mL, e agitação em sistema vortex por 30 min. O efeito da interação dos corantes na banda de extinção das AuNEs foi analisado por espectroscopia no UV-VIS nas mesmas condições dos experimentos anteriores. Todo o procedimento experimental está retratado esquematicamente na Figura 11.

Figura 11 – Procedimento experimental do estudo de interação das AuNEs com Quit como protetor superficial e os corantes estudados.



Fonte: Elaborado pela própria autora

3.3.6 Influência na intensificação do sinal SERS pela ordem de adição do corante

Após o estudo da interação das AuNEs com a Quit e os corantes por UV-VIS, também foi realizada uma investigação da adsorção dos corantes em AuNEs protegidas ou não por Quit pela técnica de espectroscopia SERS com radiação excitante em 633 nm.

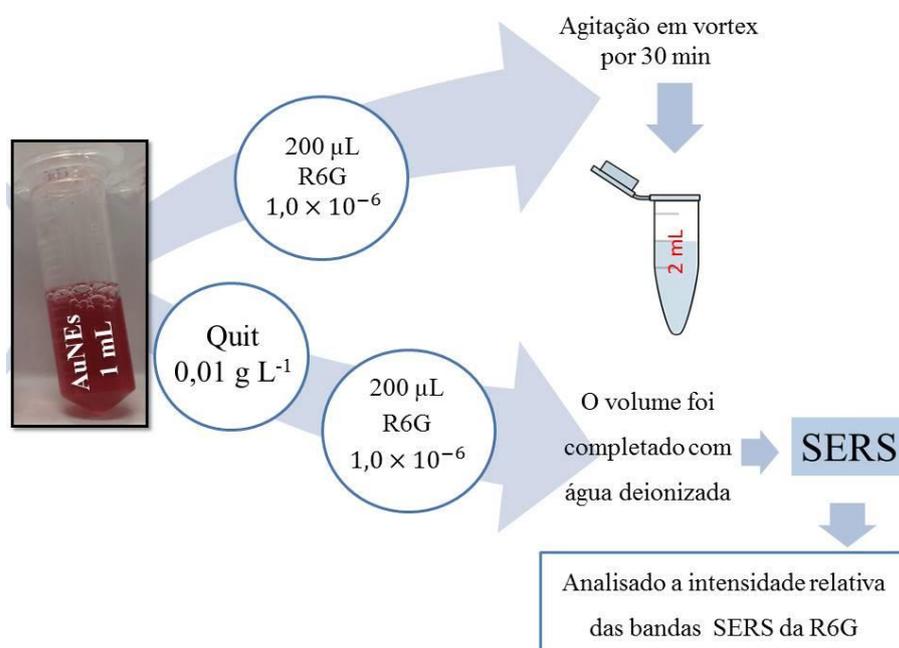
Para a realização deste experimento, a concentração dos corantes em todas as análises foi mantida em $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A montagem também seguiu o mesmo procedimento utilizado para as análises no UV-VIS, adicionou-se 1,0 mL de AuNEs, 200,0 µL de Quit e os corantes, e água deionizada para completar os 2,0 mL. O volume das soluções de Quit e de corante foi sempre mantido fixo, variando-se a concentração da solução adicionada inicialmente, para se chegar à concentração final desejada no volume total de 2,0 mL. A diferença foi que os experimentos foram realizados invertendo a ordem de adição da Quit, adicionando-a antes ou após a adição do corante. Em alguns procedimentos estavam presentes em suspensão dois corantes: um aniônico (IR-820) e um catiônico (CV ou R6G). Os experimentos também foram realizados com a variação da concentração de Quit, e estas foram: 0,0010; 0,010; 0,10 e 1,0 g L⁻¹. Todos estes experimentos foram realizados com o intuito de entender melhor o comportamento da Quit como protetor superficial em AuNEs, para observar se a concentração de Quit no meio ou a sua ordem de adição influenciaria na intensificação do sinal SERS, que diretamente pode estar relacionada com o número de moléculas do analito que estão adsorvidas ou interagem com a superfície metálica das AuNEs. Todas as medidas em espectrômetro foram realizadas de acordo com o descrito anteriormente.

3.3.7 Experimentos para a modulação do sinal SERS da R6G pelo controle na formação de *hot spots*

Para este experimento, dentre os corantes utilizados neste trabalho, escolheu-se trabalhar com a R6G, por ser um corante já bem conhecido em literatura e apresentar um bom sinal SERS (LI; LI; YU, 1999; POTARA *et al.*, 2012; RODRIGUES; ANDRADE; TEMPERINI, 2013). Para a montagem do experimento inicial seguiu-se a seguinte ordem de adição dos reagentes: 1,0 mL da suspensão de AuNEs, quando não protegidas por Quit foi adicionado diretamente 200,0 µL do corante para uma concentração final de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e completou-se o volume para 2,0 mL com água deionizada, permaneceu em agitação em vortex por 30 min. Quando foi utilizado a Quit como protetor superficial, ela foi adicionada anteriormente à adição do corante para uma concentração final de Quit de 0,01 g L⁻¹. Também

utilizou uma amostra como branco que continha somente as AuNEs e Quit, nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente. Após a montagem destes experimentos foram realizadas as medidas SERS das suspensões, e os espectros obtidos em um pequeno suporte plástico com cerca de 200,0 μL da suspensão a ser estudada. A intensidade relativa das bandas SERS da R6G foram analisadas, e medidas de acordo com um trabalho anterior (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). A montagem experimental é abordada esquematicamente na Figura 12.

Figura 12 – Procedimento experimental para o estudo do sinal SERS da R6G pelo controle na formação de *hot spots*.

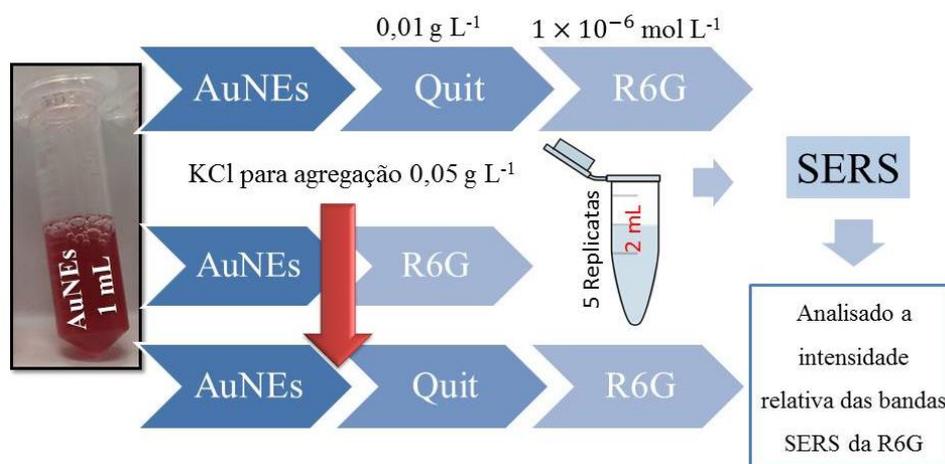


Fonte: Elaborado pela própria autora

A fim de compreender o papel da Quit no desempenho SERS, foi realizado outro experimento para monitorar a intensidade SERS da R6G, mas agora com o agente agregante KCl presente na concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Foram realizadas medidas em três diferentes condições: AuNEs seguido de Quit e R6G, AuNEs seguido de KCl para agregação e por último R6G, e para o último teste: AuNEs seguido de KCl depois Quit e por último R6G. As concentrações de AuNEs e Quit foram as mesmas do parágrafo anterior, e o procedimento encontra-se esquematizado na Figura 13. O espectro SERS foi obtido de cada uma dessas suspensões e as intensidades relativas SERS foram medidas levando em consideração a média

de 5 replicatas diferentes para cada condição estudada, levando em consideração o máximo de absorção da banda da água em 3200 cm^{-1} .

Figura 13 - Procedimento experimental para o estudo do sinal SERS da R6G pelo controle na formação de *hot spots* na presença do agente agregante KCl.



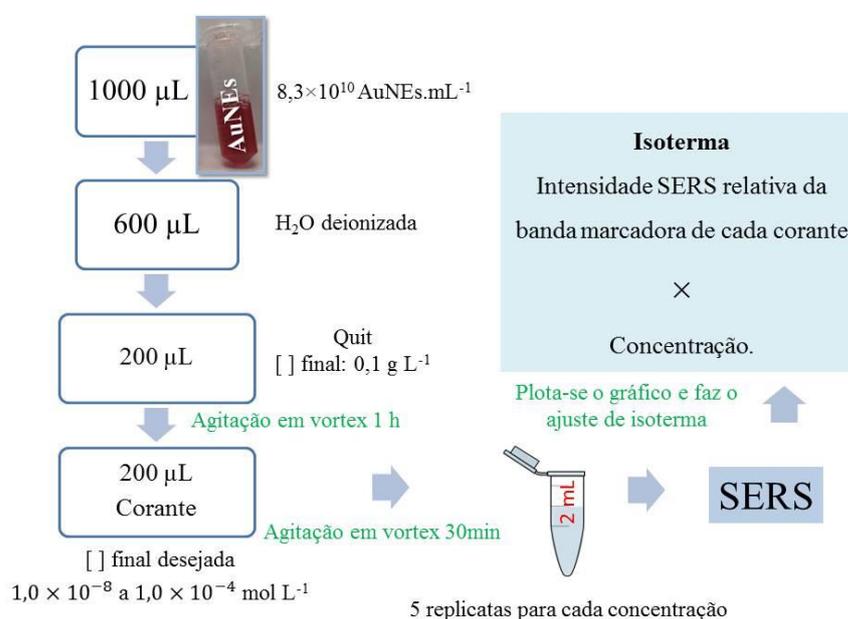
Fonte: Elaborado pela própria autora

3.3.8 Construção das isotermas de adsorção dos corantes adsorvidos em AuNEs pelo monitoramento da intensidade relativa SERS

Após o estudo de proteção superficial das AuNEs, tentou-se construir isotermas de adsorção utilizando as AuNEs e os corantes CV, IR-820 e R6G, com o efeito SERS como técnica de monitoramento. Para construir as isotermas de adsorção, as AuNEs foram protegidas superficialmente por Quit $0,1\text{ g L}^{-1}$, e foi estudada a adsorção dos corantes citados. Após a proteção com Quit foi adicionado o corante desejado variando as concentrações de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$. Para cada concentração de corante, foram realizadas medidas de 5 replicatas. Este procedimento se desenvolveu da seguinte maneira: adicionou-se 1,0 mL de AuNEs em frasco tipo Eppendorf, 600,0 μL de água deionizada e 200,0 μL de Quit $1,0\text{ g L}^{-1}$ para uma concentração final de Quit de $0,1\text{ g L}^{-1}$. Esse sistema permaneceu em agitação em vortex por 1 hora, seguido da adição de 200,0 μL do corante em uma determinada concentração inicial que ao se obter o volume total de 2,0 mL, chegava-se assim à concentração final desejada para cada ponto na construção da isoterma. O sistema permaneceu em agitação em vortex por mais 30 minutos. Posteriormente foi realizada a medida SERS de cada amostra.

Após as medidas SERS, para a construção do gráfico de isotermas foi construído um gráfico da medida de concentração *versus* intensidade relativa da banda marcadora SERS de cada corante. Para obter a intensidade relativa, a média sobre 5 replicatas da intensidade da banda SERS mais intensa de cada corante, foi normalizada pela banda da água na região de 3200 a 3500 cm^{-1} . Plotou-se a isoterma para cada corante e realizou-se o ajuste do modelo de isoterma de Langmuir aos dados experimentais. Na Figura 14 tem-se uma representação esquemática da montagem dos experimentos.

Figura 14 – Método para a construção das isotermas de adsorção de corantes em AuNEs pelo monitoramento da intensidade relativa SERS.



Fonte: Elaborado pela própria autora

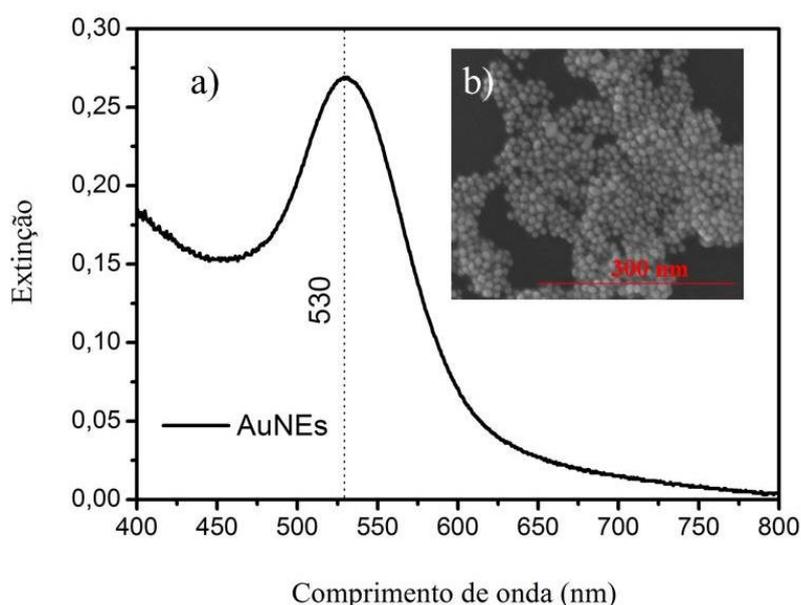
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AuNEs E CORANTES POR ESPECTROSCOPIA NO UV-VIS

Para a realização dos estudos neste trabalho foram utilizadas NPs metálicas de ouro em formato de esferas (AuNEs). O espectro de extinção típico dessas AuNEs é apresentado na Figura 15(a). Já é conhecido que estas AuNEs apresentam tamanhos de 40 nm (FRENS, 1973; ZHAO; LI; ASTRUC, 2013), sendo características um máximo do plasmon de absorção de superfície na região de 530 nm, similar ao espectro de extinção da síntese das AuNEs obtidas neste estudo.

Além da caracterização por UV-VIS, também é muito comum utilizar da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para caracterizar este tipo de material. Após a caracterização por UV-VIS, foram realizadas medidas de MEV das AuNEs para complementar a caracterização, como apresentado na Figura 15(b). Foi possível observar pelo MEV, Figura 15(b), que a síntese realizada proporcionou a formação de NPs metálicas com formato de esferas em um tamanho de 40 nm, o que também está de acordo com o plasmon em 530 nm obtido pelo UV-VIS. Após a análise por MEV da síntese das AuNEs, também foi realizado uma estimativa da sua concentração em suspensão, o que com um tamanho de 40 nm nos possibilita estimar em $8,3 \times 10^{10}$ AuNEs·mL⁻¹ a concentração de AuNEs.

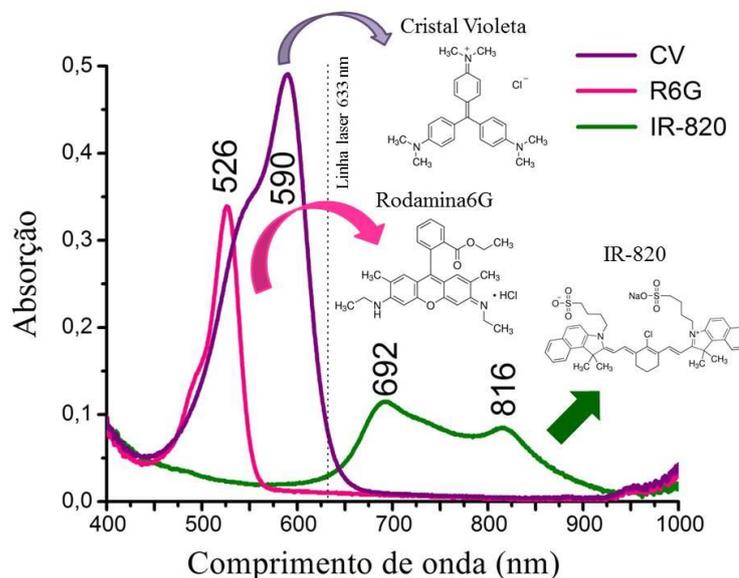
Figura 15 – (a) Espectro de extinção no UV-VIS das AuNEs de acordo com a síntese de Frens (1973). (b) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da síntese das AuNEs.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Observado o espectro de extinção no UV-VIS das AuNEs, é importante também determinar onde se localizam as bandas de absorção dos compostos a serem adsorvidos na superfície metálica das AuNEs e que apresentarão sinais SERS característicos do composto. Foram realizadas medidas no UV-VIS das soluções em concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes a serem estudados durante todo o trabalho, os espectros de absorção são apresentados na Figura 16, onde a linha tracejada indica a radiação excitante para a obtenção dos espectros Raman em 633 nm. Como observado, os corantes CV e IR-820 apresentam bandas de absorção em 590 e 692/816 nm, respectivamente, e, portanto, em pré-ressonância na linha laser 633nm, utilizada nos espectros SERS para estudar a interação superficial com a superfície metálica das AuNEs. Por outro lado, a banda de absorção da R6G em 526 nm está fora da condição de ressonância com essa linha laser. A absorvidade molar (ϵ) dos corantes R6G, CV e IR-820 nos seus máximos de absorção respectivamente: $6,8 \times 10^4$; $1,0 \times 10^5$; $2,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Figura 16 – Espectro de absorção no UV-VIS das soluções dos corantes CV, R6G e IR-820 e suas estruturas moleculares, concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



4.2 ESTABILIDADE DAS AuNEs NA PRESENÇA DE QUITONASA COMO UM PROTETOR SUPERFICIAL

A agregação de AuNEs tem como característica o aparecimento de uma segunda banda LSPR em maiores comprimentos de onda, ou até mesmo o desaparecimento da sua

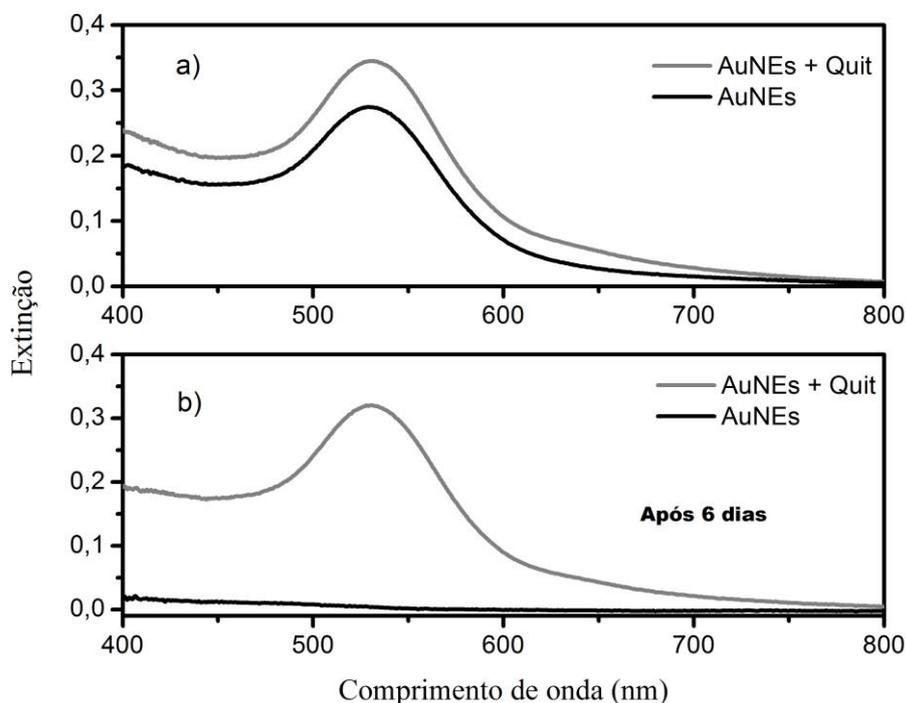
banda LSPR característica quando há precipitação dos aglomerados formados. Entretanto, já é conhecido que a proteção ou recobrimento superficial de NPs por materiais de recobrimento como os polímeros e biopolímeros pode prevenir este tipo de agregação e fornecer estabilidade às AuNEs (DOYEN *et al.*, 2016). Para entender as melhores condições de estabilidade das AuNEs, foram preparados testes a fim de observar a estabilidade das AuNEs com e sem proteção superficial pelo biopolímero Quit, em temperatura ambiente, analisando o fator tempo de exposição.

Na Figura 17, são apresentados os espectros LSPR das AuNEs com e sem proteção superficial por Quit preparadas como descrito no item 3.3.2. As AuNEs com e sem proteção superficial foram deixadas em repouso na temperatura ambiente, analisando o fator tempo de exposição por um período de 6 dias de exposição, Figura 17(b).

Na Figura 17(a) é possível observar a banda de extinção característica da formação de AuNEs em 530 nm, tanto na presença ou ausência de Quit. Quando as AuNEs estão na presença de Quit ocorre um pequeno aumento de intensidade da banda LSPR característica, esse acontecimento pode ser atribuído à interação da Quit com a superfície das AuNEs pela substituição dos íons citrato (DOYEN *et al.*, 2016).

Após os 6 dias de repouso em temperatura ambiente, não observa-se o aparecimento de bandas em maiores λ , o que seria caracterizado por instabilidade e agregação coloidal Figura 17(b). Este resultado pode indicar a maior estabilidade das AuNEs quando na presença do biopolímero Quit. Também foi possível observar que nas condições estabelecidas a banda LSPR característica da formação das AuNEs desaparece completamente após os 6 dias de exposição à temperatura ambiente e em repouso, o que implica que as AuNEs foram removidas totalmente da suspensão pela completa precipitação destas, e confirma que sem proteção superficial, estas mostraram-se instáveis nas condições e tempo de exposição estudados, Figura 17(b).

Figura 17 – (a) Espectros UV-VIS das AuNEs na ausência e presença do biopolímero Quit; (b) Espectro UV-VIS das mesmas soluções após um tempo de repouso de seis dias à temperatura ambiente.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Por outro lado, quando em solução temos as AuNEs protegidas superficialmente por Quit, não se observa nenhuma mudança em seu espectro LSPR após os seis dias de repouso a temperatura ambiente. Esse fenômeno pode ser considerado devido à efetiva proteção superficial pelo biopolímero, prevenindo a agregação e precipitação. Esse fato pode ser explicado baseado na interação da Quit com a superfície de ouro das AuNEs, com a remoção das moléculas de citrato superficiais que apresentam cargas negativas (DOYEN *et al.*, 2016). Esta interação é comprovada na literatura pelo fato de que quando a Quit é incorporada na suspensão coloidal ocorre uma pequena agregação, observada por um pequeno alargamento e deslocamento na banda UV-VIS (FILGUEIRAS, 2013).

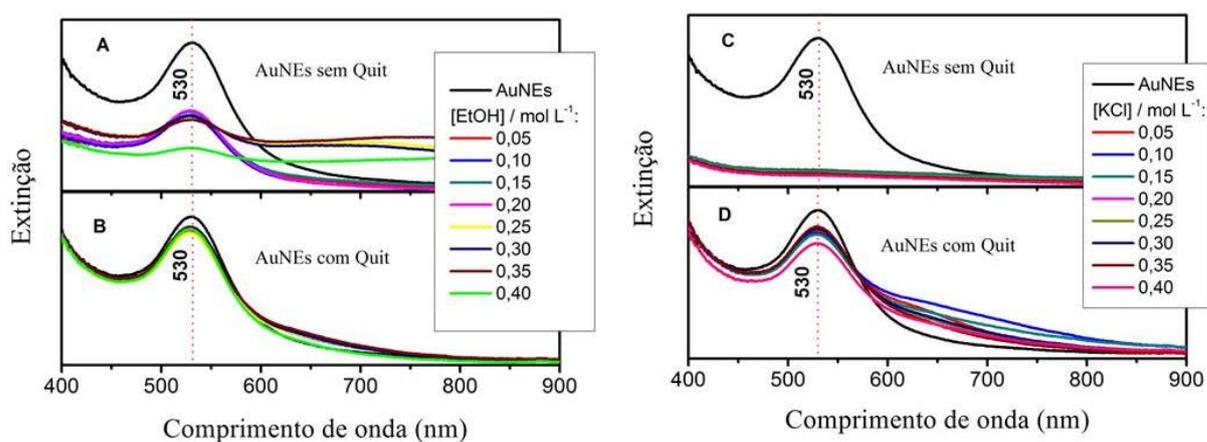
Pode-se concluir que a Quit aumentou a estabilidade das AuNEs, sendo interessante o recobrimento com esse biopolímero para possíveis aplicações biológicas, visto que a Quit é atóxica e pode melhorar as propriedades biomédicas das superfícies metálicas e até diminuir a toxicidade (DUAN *et al.*, 2014; GARABAGIU; PESTEAN; STEFAN, 2013; SUN *et al.*, 2014).

4.3 INDUÇÃO DA AGREGAÇÃO DAS AuNEs POR AGENTES AGREGANTES

É de conhecimento que AuNEs sintetizadas segundo os métodos propostos por (FRENS, 1973) consiste em um núcleo de Au com carga superficial negativa devido à presença de excesso de citrato, sendo esta responsável por prevenir a agregação das AuNEs em solução e condicionar estabilidade, por causa de repulsões eletrostáticas entre a dupla camada iônica e AuNEs vizinhas (DUTTA *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2002; LIAO *et al.*, 2003; TSUTSUI *et al.*, 2001). Também é de conhecimento que a agregação das AuNEs pode ser causada pelo aumento das ligações iônicas quando os íons interagem com a superfície do ouro pela redução das forças de repulsão entre as partículas.

Para entender melhor a interação superficial da Quit com as AuNEs, um estudo de indução de agregação foi proposto, no qual a agregação das AuNEs foi induzida pela adição de agentes agregantes considerados fortes, como KCl e EtOH. As concentrações dos agentes agregantes nesses experimentos variaram de 0,05 a 0,4 mol L⁻¹. Neste caso, foram utilizados AuNEs protegidas superficialmente com Quit na concentração 0,1 g L⁻¹, e também AuNEs sem a presença da Quit como protetor superficial, como método comparativo. A concentração de agente agregante adicionado para ambos os ensaios sempre foi à mesma. A resistência aos efeitos dos agentes agregantes pode ser verificada pela manutenção das posições e intensidades dos espectros LSPR. A Figura 18 apresenta o espectro UV-VIS das AuNEs com e sem proteção superficial pelo biopolímero Quit, destacando as mudanças na banda LSPR em 530 nm, característica das AuNEs.

Figura 18 – Espectro UV-VIS de extinção da AuNEs: (A) e (B) agregação por etanol; (C) e (D) agregação por KCl, sendo (A) e (C) AuNEs sem proteção superficial por Quit e (B) e (D) AuNEs protegidas por Quit.



Fonte: Elaborado pela própria autora

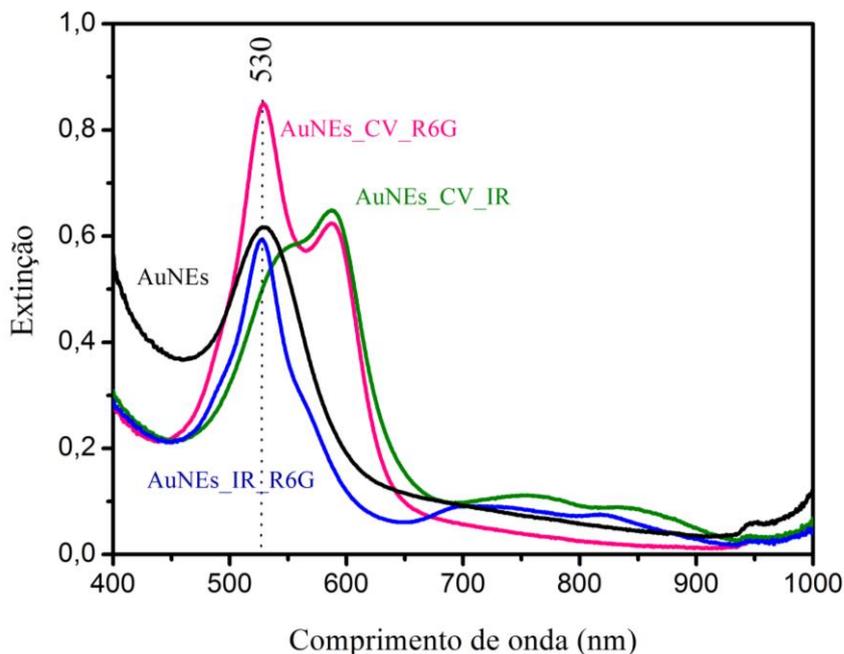
Foi possível observar pela Figura 18(a) e Figura 18(c) que ambos os agentes agregantes utilizados, KCl e EtOH, são fortes agentes agregantes para as AuNEs sem proteção superficial, o que é confirmado pelo desaparecimento da banda característica dos coloides em 530 nm para as concentrações 0,05 a 0,4 mol L⁻¹ de KCl e EtOH, respectivamente. Já quando as AuNEs estavam protegidas por Quit na concentração 0,1 g L⁻¹, estas apresentaram uma maior estabilidade em relação às não protegidas frente às mesmas concentrações de KCl e EtOH adicionados, como pode ser verificado pela manutenção das bandas LSPR nas Figura 18(b) e Figura 18(d) para todas as concentrações estudadas.

Ocorreu, por outro lado, mudança na intensidade da banda de extinção em 530 nm, o que indica uma variação no estado de agregação das AuNEs. Esses resultados confirmam que a Quit funciona como um bom estabilizador e protetor superficial das AuNEs, prevenindo a agregação adicional destas pela intervenção de fortes agentes agregantes como o KCl e EtOH, como esperado a partir de resultados prévios na literatura (HUANG *et al.*, 2002; LIAO *et al.*, 2003; TSUTSUI *et al.*, 2001).

4.4 INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE DOIS CORANTES NO PLASMON DE SUPERFÍCIE DAS AuNEs

Após obter o espectro no UV-VIS separadamente das AuNEs e das soluções dos corantes CV, IR-820 e R6G, também foram obtidos espectros UV-VIS de uma solução contendo AuNEs e os corantes de interesse na concentração final de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, que são apresentados na Figura 19. O objetivo foi determinar se ocorre alguma mudança no espectro UV-VIS quando as moléculas dos corantes interagem com a superfície das AuNEs, principalmente quando se tem a presença de dois corantes em solução. Neste caso, um pode interagir mais facilmente com a superfície das AuNEs que o outro, ter uma maior afinidade e preferência em ficar mais próximo da superfície. Os estudos seguintes se encaminharam para a busca do entendimento da adsorção superficial destes corantes sobre as AuNEs protegidas ou não por Quit, o que motivou a realização desse teste para se ter uma ideia se terá seleção por carga, já que os corantes estudados foram propositais por apresentarem diferentes cargas, de acordo com suas estruturas moleculares apresentadas na Figura 16.

Figura 19 – Espectro UV-VIS da interação entre AuNEs na presença de dois corantes de concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pela própria autora

É possível observar que ocorrem mudanças no plasmon de superfície quando as AuNEs estão na presença dos corantes. A mudança no plasmon de superfície pode indicar interação e possível adsorção com a superfície metálica das NPs. Também é possível observar a competição entre as bandas de absorção de cada corante.

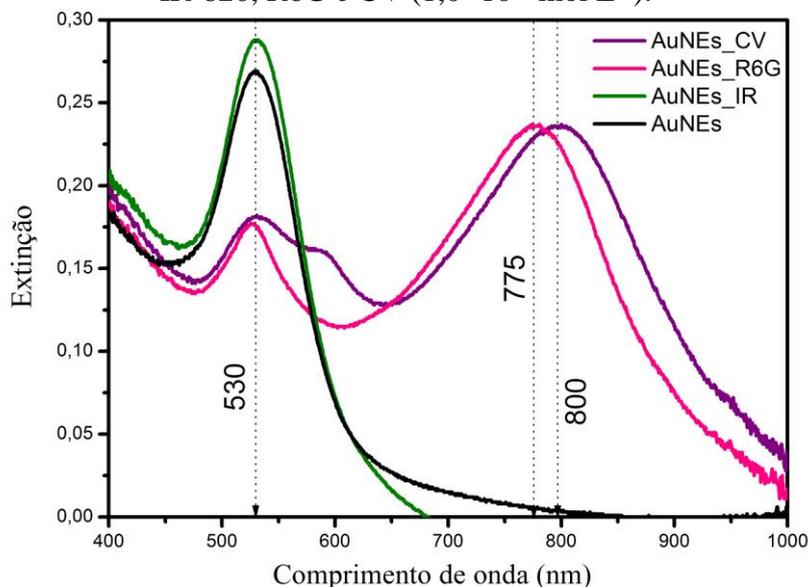
Por exemplo, é possível observar que quando se tem a presença de dois corantes, e um desses corantes é o CV, a banda característica desse corante em 590 nm aparece com maior intensidade em relação ao outro corante também em solução. Essa prevalência da banda característica do CV pode ser apenas reflexo pelo seu grande coeficiente de absorvidade molar (ϵ), ou indicar uma maior interação com os sítios ativos superficiais presentes nas AuNEs. Já quando temos o IR-820 e a R6G juntos, observa-se a banda característica dos dois corantes, sendo a banda larga do IR-820 na região de 699 nm, e a R6G em 527 nm.

O deslocamento, diminuição ou desaparecimento de intensidade da banda de *plasmon* das AuNEs também pode indicar a agregação destas. A presença de agregação descontrolada ao se adsorver uma molécula na superfície das AuNEs não é interessante para a aplicação em biossensores, por exemplo, que se apoiam na resposta ótica das AuNEs frente ao analito de interesse. Nesse tipo de aplicação busca-se manter a estabilidade do material para que seja observada uma mudança no LSPR do coloide, que é o sinal analítico para o uso da técnica em biossensores, indicando a adsorção da molécula prova de interesse.

4.5 ESTUDO UV-VIS DA INTERAÇÃO SUPERFICIAL DE AuNEs PROTEGIDAS POR QUITOSANA COM DIFERENTES CORANTES

Para entender melhor o mecanismo de interação da Quit com as AuNEs foram utilizados ensaios onde foram colocadas determinadas concentrações de corantes em contato com AuNEs protegidas ou não por Quit $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Na Figura 20 tem-se o espectro UV-VIS das AuNEs na ausência de Quit obtido nas mesmas condições experimentais anterior com os corantes estudados. Complementar a este espectro, podemos tomar como base o espectro de absorção característico destes corantes em solução aquosa e na mesma concentração em que foram realizados os experimentos, apresentados na Figura 16.

Figura 20 – Espectro UV-VIS das AuNEs sem proteção superficial por Quit na presença de IR-820, R6G e CV ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

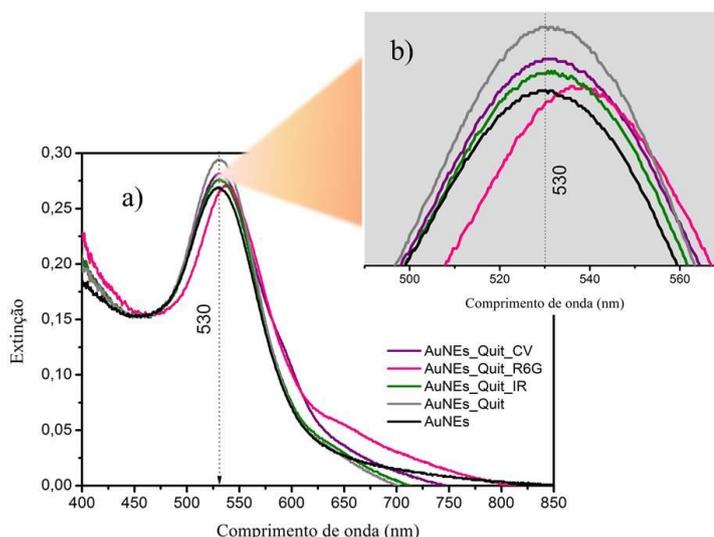
Podemos observar pela Figura 20 que, quando as AuNEs sem proteção superficial pelo biopolímero estão na presença dos corantes CV e R6G, ocorre uma grande diminuição do máximo de extinção do coloide em 530 nm, além do aparecimento de novas bandas em 775 e 800 nm, respectivamente. A presença dessas bandas é um indicativo da agregação das AuNEs causada pela adsorção dos corantes na superfície coloidal. Já quando as AuNEs estão na presença do corante IR-820 o espectro é similar ao espectro das AuNEs, não apresentando mudanças significativas. Por esse resultado, é possível observar que diferentes analitos apresentam diferentes interações com a superfície das AuNEs, além de distinguir os corantes

que causam uma agregação significativa às AuNEs (R6G e CV) e o corante que não induz uma agregação significativa (IR-820).

A atividade mais elevada dos dois primeiros corantes pode ser atribuída à carga positiva na sua estrutura molecular, que pode causar uma diminuição na repulsão eletrostática ao se adsorverem na superfície das AuNEs estabilizadas pelo ânion citrato. Esse efeito de agregação pode influenciar na intensidade SERS das espécies, uma vez que, como já é conhecido, as mudanças no estado de agregação das AuNEs podem resultar em mudança da intensidade SERS, justamente pelo aumento de *hot spot* eficientes (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). A Figura 21(a) apresenta o espectro UV-VIS das AuNEs na presença de Quit realizando o mesmo experimento anterior com os corantes estudados. Pode-se observar que a mudança LSPR em 530 nm característico das AuNEs é muito menos significativa para todos os três corantes.

As mudanças observadas para o corante R6G, que podem ser vistas mais facilmente na ampliação da região do máximo da banda na Figura 21(b), são devidas à proximidade do máximo de absorção do corante e a banda LSPR das AuNEs, que pode ocasionar esta mudança espectral pela sobreposição das bandas. Por outro lado, o ombro no espectro de suspensão contendo o CV é atribuído à banda de absorção em 590 nm (possível de ser observado na Figura 16). Pode-se concluir a partir dos resultados acima que a Quit quando adsorvida nas AuNEs previne a agregação do coloide induzida pela adsorção dos corantes, tanto catiônicos, como CV e R6G, como aniônicos, como o IR-820.

Figura 21 – (a) Espectro UV-VIS das AuNEs com proteção superficial por Quit ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) na presença de IR-820, R6G e CV ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). (b) Ampliação do espectro em (a) na região do máximo da banda de absorção.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Nos resultados de estabilidade, indução de agregação por fortes agentes agregantes e possíveis diferentes interações de acordo com os corantes estudados, foi possível observar que quando estão protegidas pela Quit, as AuNEs apresentam maior estabilidade temporal a temperatura ambiente (aproximadamente 27°C). Além disso, o recobrimento leva a uma maior estabilidade superficial das AuNEs na presença de determinadas moléculas, como corantes catiônicos e aniônicos. Tendo em vista essa possibilidade, também foram realizados estudos de interação superficial por espectroscopia SERS dos corantes, quando estes são adsorvidos na superfície das AuNEs recobertas por Quit.

4.6 INFLUÊNCIA DA ORDEM DE ADIÇÃO DOS CORANTES NAS AuNEs PARA INTENSIFICAÇÃO DO SINAL SERS

Sabe-se da necessidade de estudar mais profundamente a influência de AuNEs recobertas por polímeros (SUN *et al.*, 2014), onde a Quit vem se mostrando promissora por ser um biopolímero natural, solúvel e atóxico, pode ser utilizado para o recobrimento e funcionalização superficial de AuNEs para aumentar a estabilidade dessas e evitar a agregação em solução (COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Para entender melhor a interação de AuNEs com a Quit, neste trabalho utilizou-se a técnica SERS para estudar o comportamento das AuNEs com e sem recobrimento por Quit quando interagem com os corantes CV, R6G e IR-820. O principal objetivo foi observar se as interações das AuNEs recobertas por Quit com corantes de diferentes cargas superficiais teriam influência sobre o efeito SERS. Foi também estudado se a ordem da adição das espécies, especialmente da Quit, influenciaria na adsorção do corante à superfície metálica das AuNEs e, conseqüentemente, no espectro SERS.

A investigação da adsorção do corante se deu pela técnica de espectroscopia SERS com radiação excitante em 633 nm. A concentração dos corantes em todas as análises foi mantida em $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Para tentar entender como a Quit protegeria a superfície das AuNEs ou permitiria seletividade por carga dos corantes, inicialmente propôs-se uma modificação na ordem de adição dos compostos em solução, apresentada na Tabela 1, e comparou-se as medidas variando a concentração de Quit em 0,0010; 0,010; 0,10; 1,0 g L⁻¹:

Tabela 1 – Ordem da adição das soluções para as medidas SERS.

Ensaio	Ordem de adição
1	AuNEs_Quit_Corante aniônico ^a _Corante catiônico ^b
2	AuNEs_Quit_Corante aniônico
3	AuNEs_Corante aniônico_Quit_Corante catiônico
4	AuNEs_Corante aniônico_Quit
5	AuNEs_Corante aniônico
6	AuNEs_Corante catiônico
7	AuNEs_Quit

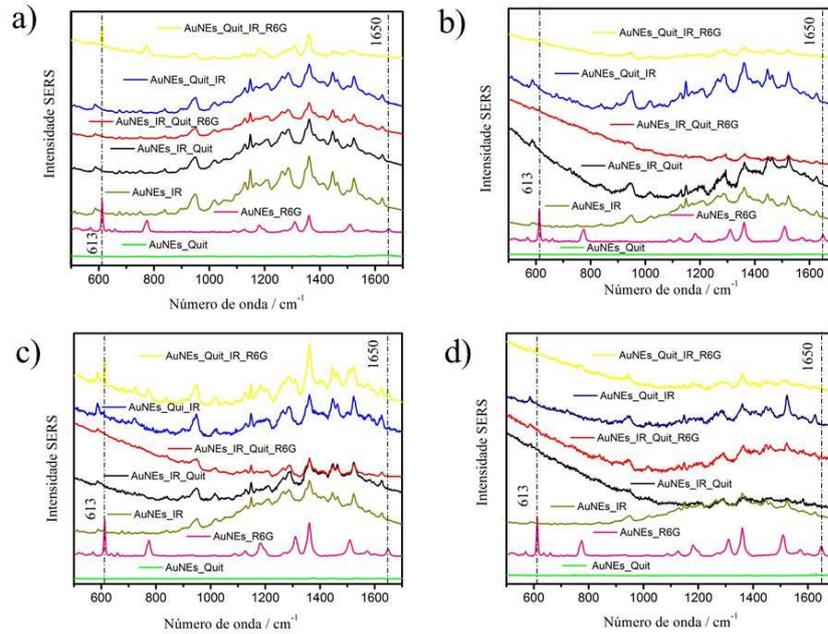
^aIR-820. ^bCV ou R6G.

Fonte: Elaborado pela própria autora

Como observado, a Quit foi adicionada na solução de AuNEs antes e depois da adição do um dos corantes em alguns ensaios, e também foi realizado a medida SERS dos corantes nas AuNEs sem a proteção superficial pelo polímero, além das AuNEs com a presença somente de Quit. Os espectros SERS para cada ensaio para diferentes concentrações de Quit e para diferentes pares de corantes são apresentados nas Figuras 22, 23 e 24.

Destacando as características específicas de cada Figura, pelos espectros da Figura 22, comparando o sinal SERS do corante aniônico IR-820 e catiônico R6G, também podemos afirmar que a superfície protegida por Quit não apresenta uma seletividade por carga, pois mesmo com a presença do IR-820, observam-se bandas fracas características da R6G, como as bandas em 613 e 1650 cm^{-1} . Também é visto que as bandas do corante aniônico IR-820 se mostram mais intensas quando comparado com as bandas do corante catiônico R6G. A baixa intensidade dos espectros SERS da R6G quando comparados com a intensidade obtida para o IR-820 deve-se à pré-ressonância desse último com a linha laser de excitação 633 nm.

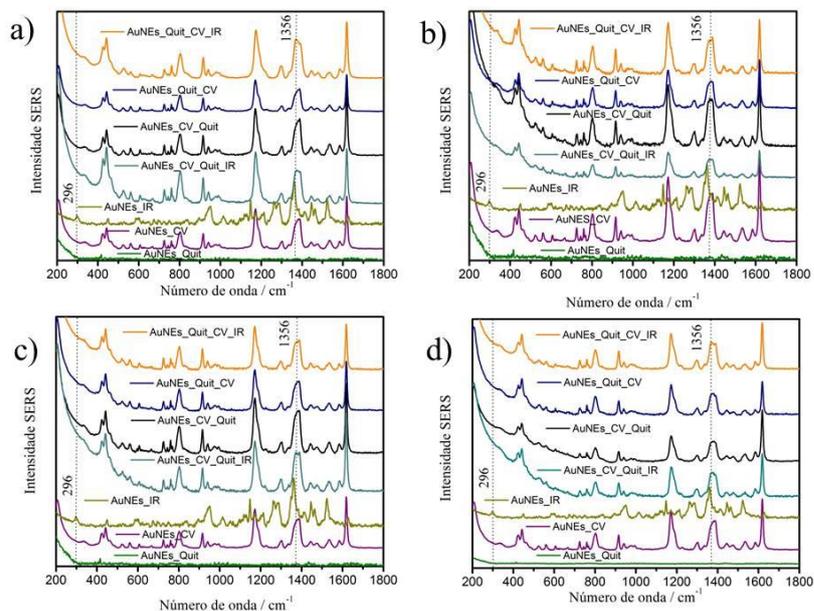
Figura 22 – SERS em AuNEs do IR-820 e R6G, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L⁻¹; b) 0,01 g L⁻¹; c) 0,1 g L⁻¹; d) 1,0 g L⁻¹.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Levando isso em consideração, foi proposta a troca do corante catiônico pelo CV, que também apresenta pré-ressonância em 633 nm, para comparação com o IR-820 em novas análises SERS em diferentes concentrações de Quit, e os espectros são apresentados na Figura 23.

Figura 23 – SERS em AuNEs do CV e IR-820, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L⁻¹; b) 0,01 g L⁻¹; c) 0,1 g L⁻¹; d) 1,0 g L⁻¹.

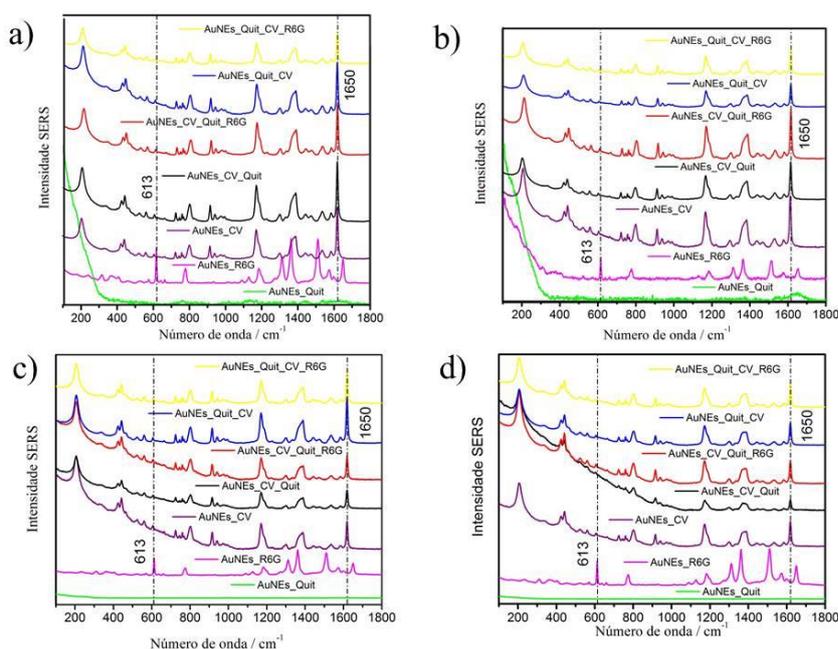


Fonte: Elaborado pela própria autora

Como pode ser observado na Figura 23, as bandas SERS características do CV se sobressaíram em intensidade quando comparados com os espectros SERS do IR-820 ou quando estes dois corantes estão juntos. Mesmo assim foi possível observar a influência do IR-820 quando identificamos nos espectros a banda característica desse corante em 1356 cm^{-1} . Esta banda está próxima a uma banda do corante CV, mas quando esses dois corantes estão juntos, a banda SERS do CV fica mais larga e desloca-se para menores números de onda, o que indica que o IR-820 tem acesso à superfície da AuNEs, e a diferença de intensidades está relacionada à maior seção de choque efetiva do CV. Com o aumento da concentração de Quit não se observaram modificações na intensidade dos espectros e podemos concluir que a Quit apresenta baixa seletividade à carga dos corantes.

Visto essa baixa seletividade das AuNEs protegidas por Quit pela carga dos analitos, decidiu-se realizar também o SERS de dois corantes catiônicos CV e R6G em conjunto na presença de Quit, como mostrado na Figura 24.

Figura 24 – SERS em AuNEs do CV e R6G, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) $0,001\text{ g L}^{-1}$; b) $0,01\text{ g L}^{-1}$; c) $0,1\text{ g L}^{-1}$; d) $1,0\text{ g L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Foi apresentado que o CV é um corante catiônico e pré-ressonante na excitação utilizada 633 nm, como observado no UV-VIS na Figura 16, com banda de absorção em 590 nm. Por essa característica podemos observar no espectro SERS que suas bandas são bem mais intensas, quando comparadas com a intensidade SERS da R6G.

Com o aumento da concentração de Quit, se os espectros forem comparados, foi possível observar uma variação, não tão significativa, na relação sinal/ruído da intensidade SERS do corante CV, o que pode ser devido à sua ressonância e absorvidade molar comparado com os outros dois corantes estudados. Mesmo com a forte ressonância do CV, ainda é possível ver bandas pouco intensas da R6G nos espectros SERS.

Também pode-se concluir pelos espectros SERS nas Figuras 22 a 24 que, quando as AuNEs estão sem recobrimento de Quit temos as bandas características de cada corante, apresentado pelos ensaios 4 e 5 na (Tabela 1). Já quando obtivemos o SERS das AuNEs somente com o biopolímero Quit, independente da concentração, não se verifica qualquer banda característica do biopolímero, ensaio 7 (Tabela 1). O que indica que o sinal do corante quando em presença da Quit não é influenciado por alguma banda característica do biopolímero adsorvido em superfície.

A ordem de adição da Quit não provocou uma melhor proteção superficial contra a adsorção dos corantes quando ela é adicionada primeiro que os corantes, o que poderia ser esperado principalmente para os corantes catiônicos, Ensaios 1 e 2 (Tabela 1). Em ambas as ordens de adição, observam-se as bandas características dos corantes, possível de observar na realização dos ensaios de 1 a 4, de acordo com a ordem de adição descrita na Tabela 1, e pelos espectros SERS obtidos.

Quando se comparam os espectros SERS para o mesmo ensaio com Quit (ensaios 1 a 4 na Tabela 1) e aumentando a concentração de Quit, observa-se uma diminuição da relação sinal/ruído para todos os pares de corantes estudados, principalmente para a concentração de Quit de $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Como exemplo, pode-se citar o ensaio 4 na Figura 22, que apresenta uma diminuição marcante na intensidade SERS do IR-820 quando se compara com as Figura 22(a), (b) e (c). Essa diminuição de intensidade SERS pode ser relacionada com uma quantidade maior de Quit em volta das AuNEs, o que pode impedir que as moléculas do corante se aproximem da superfície metálica das AuNEs. Com menos moléculas do corante interagindo com a superfície metálica das AuNEs tem-se uma diminuição na intensidade do campo elétrico experimentado pela molécula e, conseqüentemente, na intensidade do sinal SERS.

4.7 MODULAÇÃO DA INTENSIDADE DO SINAL SERS DA R6G EM AuNEs PROTEGIDAS POR QUITOSANA

Considerando o discutido acima, a respeito da baixa seletividade por carga da Quit sobre as AuNEs, o passo seguinte foi entender o papel da Quit na modulação da intensidade SERS que pode ser obtida dessas AuNEs. Com a finalidade de entender esse efeito, foi utilizado o corante R6G pois, dentre os corantes estudados, é o único que não apresenta pré-ressonância com a linha laser 633 nm e, portanto, variações ocorridas com o desempenho das AuNEs serão facilmente observáveis nos espectros SERS, o que seria menos óbvio utilizando corantes em ressonância com a linha laser (AROCA, 2006). Além disso, a R6G é um dos corantes mais estudados na literatura da técnica SERS, por ter sido um dos primeiros que foram estudados em condição de única molécula SERS (NIE; EMORY, 1997).

Como já foi discutido acima, as Figura 20 e 21 apresentam o espectro de extinção das AuNEs na presença ou não de Quit, e também R6G na presença de AuNEs recobertas ou não por Quit. É interessante reafirmar aqui que o máximo de absorção da R6G é em 526 nm, sendo muito próximo à ressonância do *plasmon de superfície* localizado das AuNEs, em 530 nm. Por outro lado, quando a R6G foi adicionada à suspensão das AuNEs pode-se observar uma diminuição na intensidade da banda em 527 nm e o surgimento de outra banda na região do vermelho em 775 nm, Figura 20. A presença desta nova banda no espectro LSPR das AuNEs é um indicativo da formação de agregados das AuNEs (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Como já discutido, a agregação das AuNEs pode resultar no acoplamento eletrônico de partículas vizinhas, o que pode levar a muitas novas propriedades, entre elas principalmente ocasionar a intensificação do campo eletromagnético local em regiões entre as partículas agregadas, resultando no que é usualmente conhecido como *hot spots* (HAN *et al.*, 2011). *Hot spots* formados pela agregação de AuNEs apresentam em geral grande aumento de desempenho SERS quando comparado às nanopartículas isoladas.

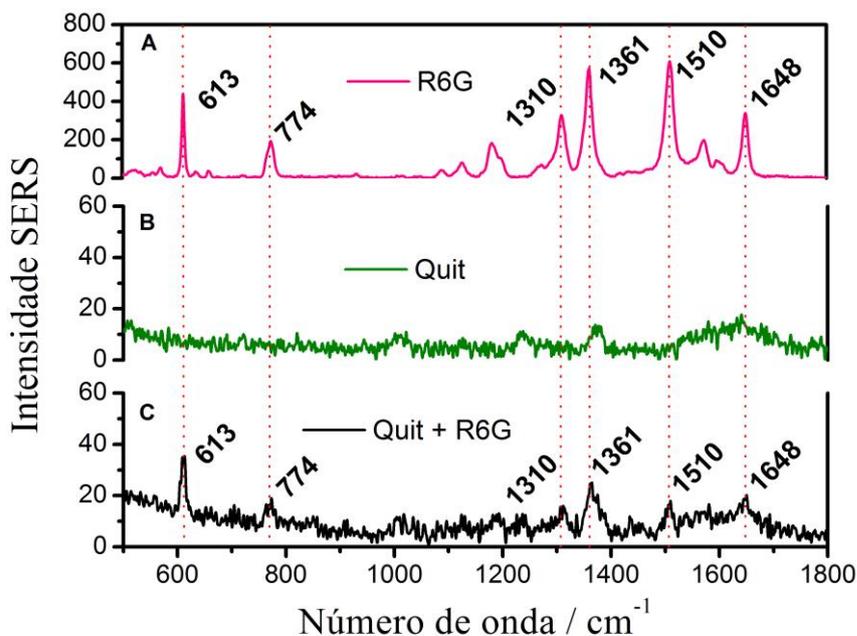
Assim, foi possível observar que ao adicionar a R6G na suspensão de AuNEs ocasionou a agregação destas, e como resultado a formação de *hot spots*. A interação de adsorventes como a R6G, um corante catiônico, com as AuNEs estabilizadas por citrato de sódio, que apresentam uma carga negativa líquida, pode perturbar a dupla camada elétrica presente nestas AuNEs, diminuindo a carga superficial e, portanto a repulsão eletrostática entre NPs, resultando em agregação (DUTTA *et al.*, 2015).

Por outro lado, quando as AuNEs foram recobertas por Quit, a presença de R6G não resultou em nenhuma nova banda LSPR no espectro UV-VIS, tendo sido possível observar

apenas um pequeno deslocamento da banda LSPR, Figura 21. Nós podemos dizer que a Quit aumenta a estabilidade das AuNEs, o que impede a agregação pela interação com o corante R6G. Estudos têm mostrado que vários ligantes presentes nas superfícies das AuNEs contribuem para a estabilidade das NPs em geral (COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; DUAN *et al.*, 2014; POTARA *et al.*, 2012).

Neste estudo, os resultados UV-VIS nas seções 4.3 e 4.5 permitiram inferir que a Quit pode oferecer uma melhor estabilidade para as AuNEs, tanto na presença do corante R6G ou outro agente agregante típico, como KCl ou EtOH. Entretanto, a influência da proteção superficial das AuNEs por Quit para o desempenho SERS ainda está para ser entendido completamente. Foram realizados mais experimentos com o intuito de entender melhor esta influência, e são apresentados nas Figuras 25 e 26. Na Figura 25(A) tem-se o espectro SERS da R6G tendo como substrato AuNEs sem recobrimento por Quit. Na Figura 25(B) está apresentado um espectro que funciona como o branco, que é referente ao espectro SERS da Quit utilizando como substrato estas mesmas AuNEs. Na Figura 25(C), apresenta-se o espectro SERS da R6G utilizando como substrato as AuNEs protegidas superficialmente por Quit.

Figura 25 – Espectro SERS das AuNEs na presença de: (A) R6G ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹); (B) Quit 0,01 g L⁻¹; (C) Quit (0,01 g L⁻¹) + R6G ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹).



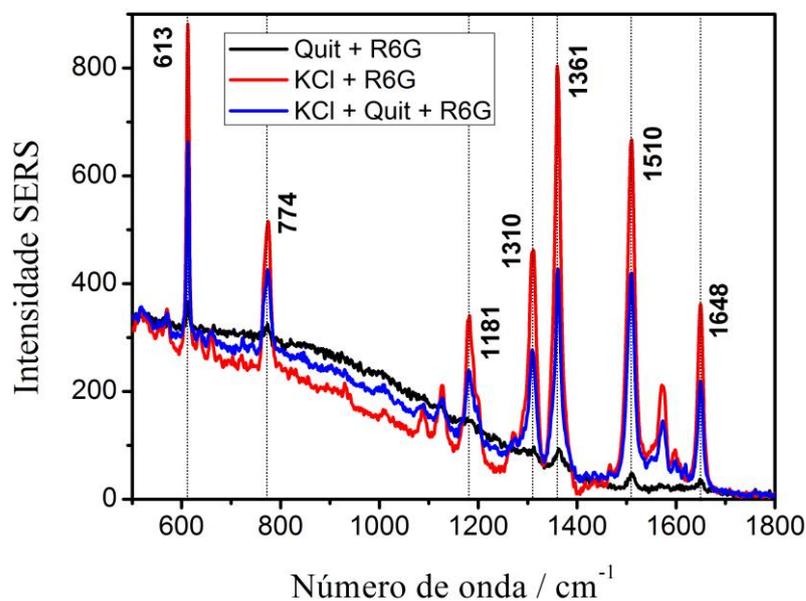
Fonte: Elaborado pela própria autora

Foi possível observar que o espectro SERS na Figura 25(C) apresenta uma considerável diminuição da intensidade das bandas características da R6G comparado com as AuNEs não protegidas por Quit, Figura 25(A), em cerca de uma ordem de magnitude. É notório que nenhuma banda intensa é observada no espectro das AuNEs com a presença somente de Quit como protetor superficial, Figura 25(B), tendo sido observadas apenas bandas muito fracas em 1020, 1240 e 1370 cm^{-1} .

Os resultados SERS acima podem ser entendidos como tendo sido causados por dois fatores diferentes. O primeiro é que a Quit provavelmente não permite a formação de *hot spots* pela R6G em solução, e o segundo é que a Quit provavelmente pode impedir que a molécula do corante se aproximasse da superfície das AuNEs. Ambos os fatores podem diminuir a intensidade SERS comparados com o SERS das AuNEs sem proteção superficial, Figura 25(A). Pode-se inferir que a Quit não permite que as moléculas do corante se aproximem da superfície das AuNEs, mas não podemos ter conhecimento de como ocorre essa proteção superficial. A baixa intensidade do sinal SERS quando as AuNEs estão protegidas por Quit não é necessariamente devida ao fato do coloide ser ruim como substrato SERS ou do corante não apresentar um bom sinal SERS, mas é possível que a Quit não permita que *hot spots* formados pela agregação do coloide apareçam ao adicionar a molécula de corante, intensificando sinal SERS em Figura 25(A).

A fim de compreender o papel real da Quit no desempenho SERS das AuNEs, a intensidade SERS da R6G foi medida em duas diferentes condições: 1) adicionou-se KCl na suspensão de AuNEs antes de adicionar o corante, mas depois de adicionar Quit; 2) adicionou-se KCl antes de adicionar a Quit. Os resultados foram comparados com o espectro da R6G adicionado nas AuNEs protegidas por Quit nas mesmas condições experimentais na ausência de KCl. Os espectros SERS são apresentados na Figura 26. Além disso, as intensidades relativas das bandas SERS são apresentadas na Tabela 2.

Figura 26 – Espectro SERS das AuNEs: 500 - 1800 cm^{-1} : Preto (protegidas por Quit (0,01 g L^{-1}) + R6G ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)); Vermelho (agregação por KCl + R6G ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)); azul (agregação KCl + proteção por Quit (0,01 g L^{-1}) + R6G ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)).



Fonte: Elaborado pela própria autora

Tabela 2 – Intensidade relativa SERS das bandas da R6G em três diferentes condições: AuNEs adicionado Quit seguido de R6G; AuNEs adicionado KCl seguido de R6G; e AuNEs adicionado KCl seguido de Quit e posteriormente R6G.

Número de onda / cm^{-1}	Intensidade relativa SERS ^a		
	Quit_R6G	KCl_R6G	KCl_Quit_R6G
613	0,934	11,664	6,711
774	0,770	5,278	2,745
1181	0,696	5,682	2,846
1310	0,766	7,778	3,844
1361	1,091	15,363	7,176
1510	0,617	11,453	6,589
1648	0,574	6,871	3,844

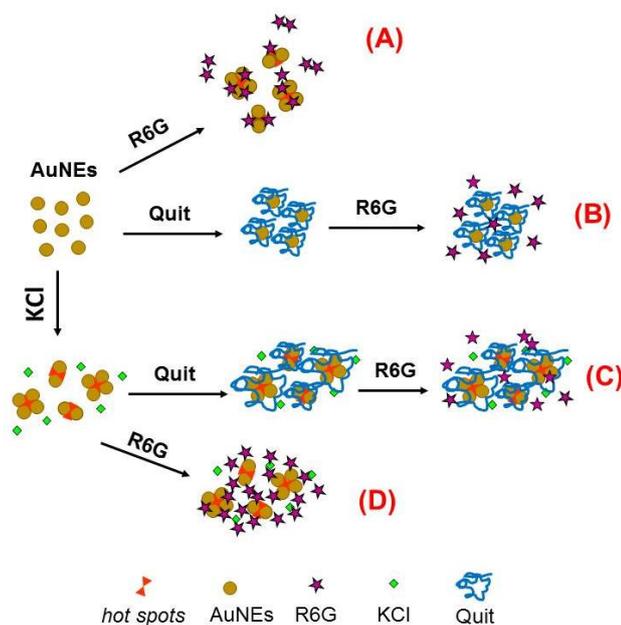
^aA intensidade relativa SERS foi medida pela relação entre a intensidade das bandas características da R6G e a banda da água em 3400 cm^{-1} no mesmo espectro (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; IZQUIERDO-LORENZO *et al.*, 2012).

Fonte: Elaborado pela própria autora

Como esperado, a intensidade SERS observada na Figura 26, quando o espectro da R6G foi obtido com adição do corante na presença de Quit e sem KCl foi muito baixa, principalmente quando comparada com as duas condições em que houve adição de KCl. Essa baixa intensidade pode ser atribuída a um nível muito baixo da formação de *hot spots* no primeiro caso. Para as AuNEs agregadas com KCl a intensidade SERS da R6G foi muito mais alta, muito similar ao que foi observado para as AuNEs na presença apenas da R6G na Figura 25(A). Finalmente, após a agregação por KCl, a Quit foi adicionada depois nas AuNEs, e só então foi adicionado a R6G na suspensão. Nesse último experimento, a intensidade SERS diminuiu praticamente pela metade quando comparado com a intensidade do processo de agregação das AuNEs sem a proteção superficial por Quit, mas ainda é cerca de 5× maior que a intensidade SERS da R6G em AuNEs protegidas por Quit e livre da agregação por KCl. O que indica que a Quit previne que as moléculas de R6G cheguem até os *hot spots* formados com a agregação causada pelo KCl.

Uma interessante observação experimental é que a adição de Quit nas AuNEs agregadas com KCl melhora a estabilidade temporal do sistema, apesar de agregado, de maneira similar ao que foi observado para o sistema sem adição de KCl. Considerando esta evidência e o resultado SERS discutido acima, pode-se considerar um modelo de interação de R6G com AuNEs nos experimentos apresentados neste estudo. Este modelo é apresentado esquematicamente na Figura 27.

Figura 27 – Representação esquemática das interações entre AuNEs e o corante R6G em três configurações experimentais diferentes.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

A alta intensidade do sinal SERS obtida para o corante R6G pode ser atribuída a dois fatores principais: a alta seção de choque intrínseca atribuída à molécula do corante e à agregação das moléculas de corante ocasionada pela substituição do citrato pela camada do corante, resultando em um grande número de *hot spots* formados na suspensão, como observado no Figura 27(A). A adição de KCl no mesmo sistema pareceu não aumentar significativamente a concentração de *hot spots*, como ilustrado no Figura 27(D), e a intensidade SERS não mudou significativamente. Por outro lado, a mudança do sistema na presença de Quit foi muito mais significativa: Quando a Quit foi adicionada diretamente nas AuNEs, a suspensão permaneceu com um pequeno número de *hot spots*, além de aumentar a resistência à formação de novos *hot spots*. A adição de R6G a esse sistema teria, portanto, resultado na interação do corante com um número muito baixo de *hot spots*, além de haver uma distância grande da superfície das AuNEs, como observado no Figura 27(B); como consequência, uma baixa intensidade SERS foi observada. Por outro lado, quando o KCl foi adicionado antes da Quit, ocorre um aumento inicial na população de *hot spots*, causado pelo agente agregante, que foi retido após adicionar o biopolímero, Figura 27(C). O aumento do número de *hot spots* poderia, então, permitir um considerável aumento na intensidade do sinal SERS, devido ao acesso da R6G a esses *hot spots*; finalmente, a diminuição da intensidade relativa do SERS quando as AuNEs estavam protegidas por Quit pode também ser atribuída à grande distância entre o corante e a superfície das AuNEs. Com base nessa discussão, e considerando a Figura 27, pode-se sugerir uma ordem de intensidade do sinal SERS para os experimentos realizados: $I(D) > I(A) > I(C) > I(B)$, além de inferir que a Quit é capaz de modular a formação e estabilidade de *hot-spots*, sem, no entanto, desfazer os que já tinham sido formados em suspensão; com isso, não há o desenvolvimento de agregados grandes e precipitação. Outro resultado muito importante foi o fato da proteção superficial das AuNEs por Quit garantir a reprodutibilidade dos resultados, fazendo com que torne-se viável os estudos de adsorção dos corantes utilizando o fenômeno SERS como monitoramento para a futura construção de isothermas.

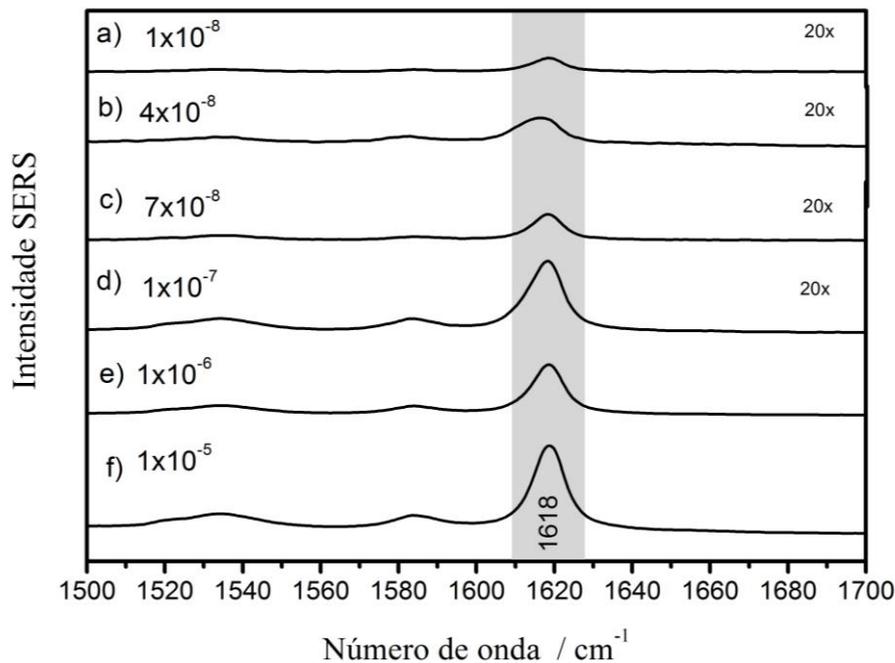
4.8 ESTUDO DA ADSORÇÃO DE CORANTES POR ESPECTROSCOPIA SERS EM AuNEs PROTEGIDAS POR QUITOSANA

Após determinar a proteção superficial das AuNEs por Quit e a capacidade de modulação de *hot spots* por Quit, o estudo do sinal SERS como função da concentração para os três corantes CV, R6G e IR-820, pôde ser realizado, já que nenhuma agregação irá ocorrer quando as AuNEs estiverem protegidas por Quit com a adição dos corantes. O espectro SERS

do CV (ALVES *et al.*, 2013), R6G (HILDEBRANDT; STOCKBURGER, 1984) e IR-820 (NEVES; ANDRADE, 2015) já foram reportados na literatura. As Figuras 28, 29 e 30 apresentam o espectro SERS do CV, IR-820, e R6G, respectivamente em diferentes concentrações. Esses espectros foram obtidos em AuNEs na presença de 0,10 g L⁻¹ de Quit.

A Figura 28 apresenta o espectro SERS para o CV com variação de concentração de 1,0×10⁻⁸ a 1,0×10⁻⁵ mol L⁻¹. Uma das bandas mais intensas no espectro SERS para o CV é a banda em 1618 cm⁻¹, atribuída ao estiramento CO do grupo carbonila mais próximo à superfície, observado em estudos SERS anteriores desse corante (ALVES *et al.*, 2013). Essa banda foi utilizada para obter a curva de intensidade versus concentração do corante CV. Para todos os três corantes estudados, a medida da intensidade do sinal SERS em função da concentração foi realizada pela medida da intensidade de uma banda representativa do corante normalizada pela intensidade da banda larga atribuída ao estiramento OH da água na região entre 3200 e 3000 cm⁻¹.

Figura 28 – Espectro SERS do CV em diferentes concentrações molares (mol L⁻¹): a) 1,0×10⁻⁸, b) 4,0×10⁻⁸, c) 7,0×10⁻⁸, d) 1,0×10⁻⁷, e) 1,0×10⁻⁶, f) 1,0×10⁻⁵. Espectro SERS (1500 a 1700 cm⁻¹) são de 5 replicatas para cada concentração com AuNEs protegidas por Quit (0,10 g L⁻¹).

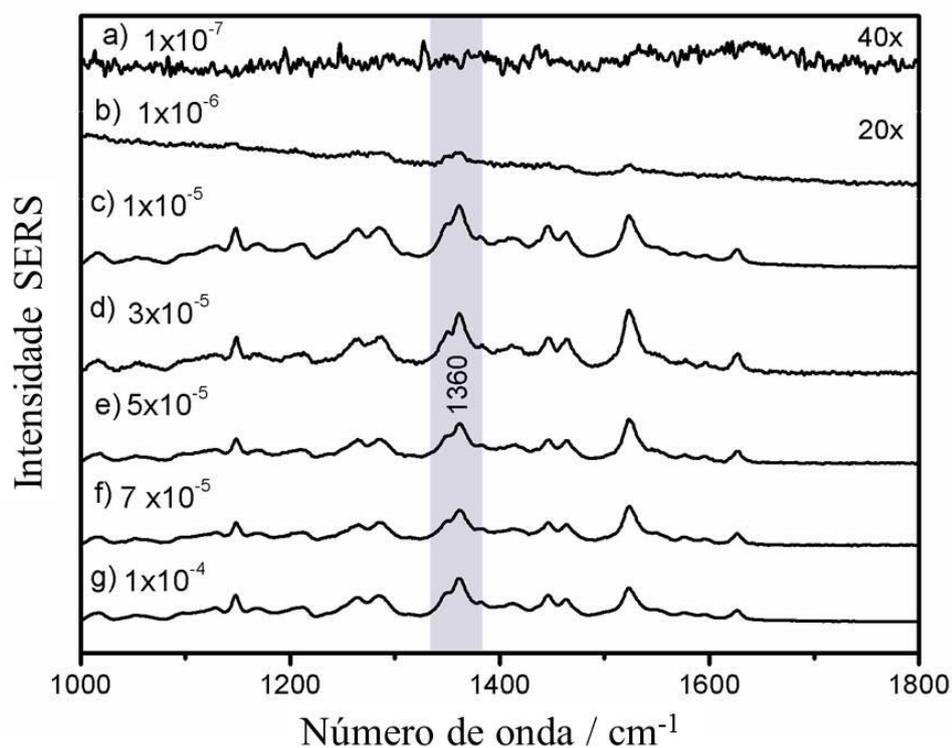


Fonte: Elaborado pela própria autora

A Figura 29 apresenta o espectro SERS do IR-820 em AuNEs protegidas com Quit em variação de concentração de corante de 1,0×10⁻⁷ a 1,0×10⁻⁴ mol L⁻¹. O espectro SERS da Figura 29 são similares aos já conhecidos na literatura para o IR-820 (NEVES; ANDRADE,

2015). Nesse caso, a banda em 1360 cm^{-1} , atribuída à deformação angular CH e torção CH_2 , foi escolhida para ter sua intensidade medida já que esta banda apresenta a maior intensidade do espectro SERS.

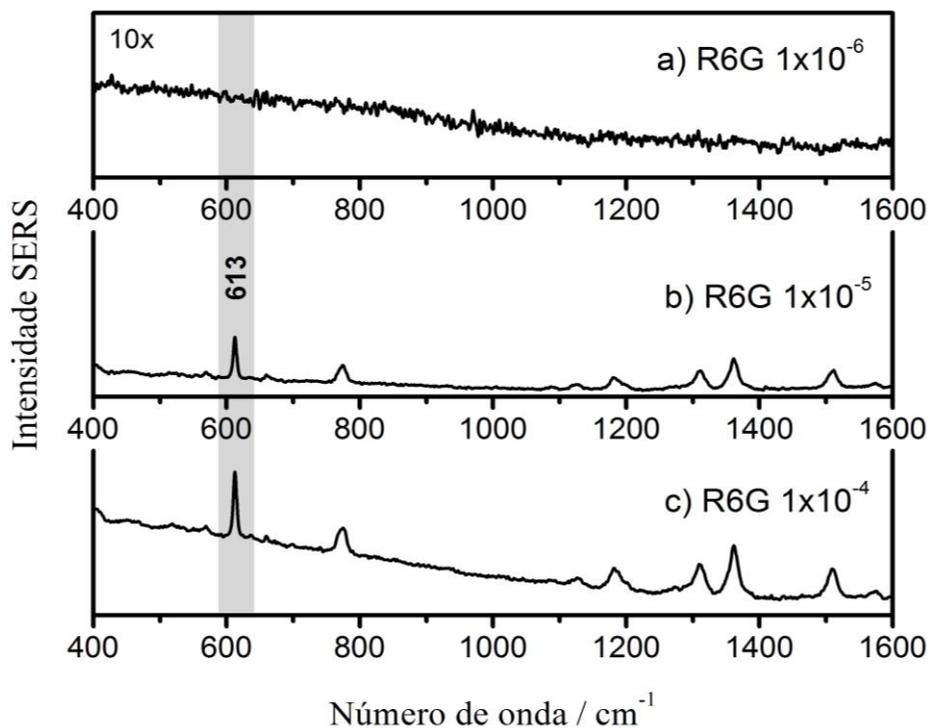
Figura 29 – Espectro SERS do IR-820 em diferentes concentrações molares (mol L^{-1}). a) $1,0 \times 10^{-7}$, b) $1,0 \times 10^{-6}$, c) $1,0 \times 10^{-5}$, d) $3,0 \times 10^{-5}$, e) $5,0 \times 10^{-5}$, f) $7,0 \times 10^{-5}$, g) $1,0 \times 10^{-4}$. Espectro SERS (1000 a 1800 cm^{-1}) são de 5 replicatas para cada concentração com AuNEs protegidas por Quit ($0,10\text{ g L}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

A Figura 30 apresenta os espectros SERS da R6G em AuNEs também protegidas por Quit, mas foi possível obter uma intensidade SERS significativa em uma faixa de concentração mais estreita, quando comparado com os corantes CV e IR-820.

Figura 30 – Espectro SERS da R6G em diferentes concentrações molares (mol L^{-1}): a) $1,0 \times 10^{-6}$, b) $1,0 \times 10^{-5}$ e c) $1,0 \times 10^{-4}$. Espectro SERS (400 a 1600 cm^{-1}) são de 5 replicatas para cada concentração com AuNEs protegidas por Quit($0,10 \text{ g L}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

Para a R6G, não foi possível obter o espectro SERS para o corante em concentrações menores que $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A R6G é bem conhecida como molécula prova de alta-performance SERS (HILDEBRANDT; STOCKBURGER, 1984; NIE; EMORY, 1997). Por isso, já que a Quit previne a agregação das AuNEs, a intensidade SERS para a R6G resultou ser menor comparado com CV e IR-820, devido à baixa afinidade da R6G para se ligar às AuNEs funcionalizadas com Quit.

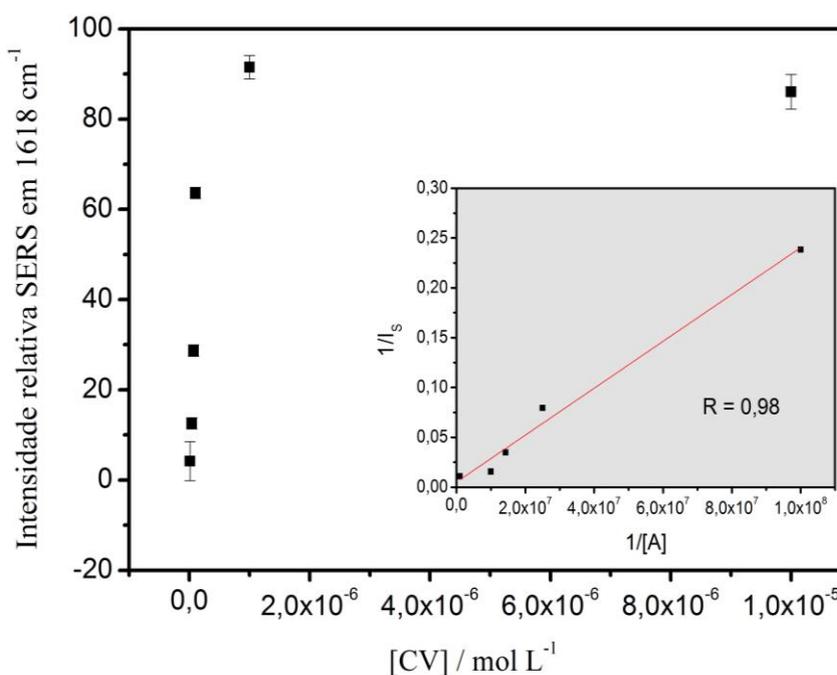
Com base nos resultados centralizamos nossa atenção no estudo de detecção dos corantes CV e IR-820, Já que para estes corantes seria possível realizar o estudo de isoterma de adsorção, devido ao grande intervalo de concentração disponível com sinal SERS para monitoração.

4.8.1 Construção das Isotermas de adsorção

Para a construção de isotermas de adsorção utilizando o efeito SERS, a intensidade das bandas escolhidas foi calculada em 5 replicatas medidas para cada concentração de cada analito, e a intensidade da banda do CV em relação à intensidade da banda da água em 3200

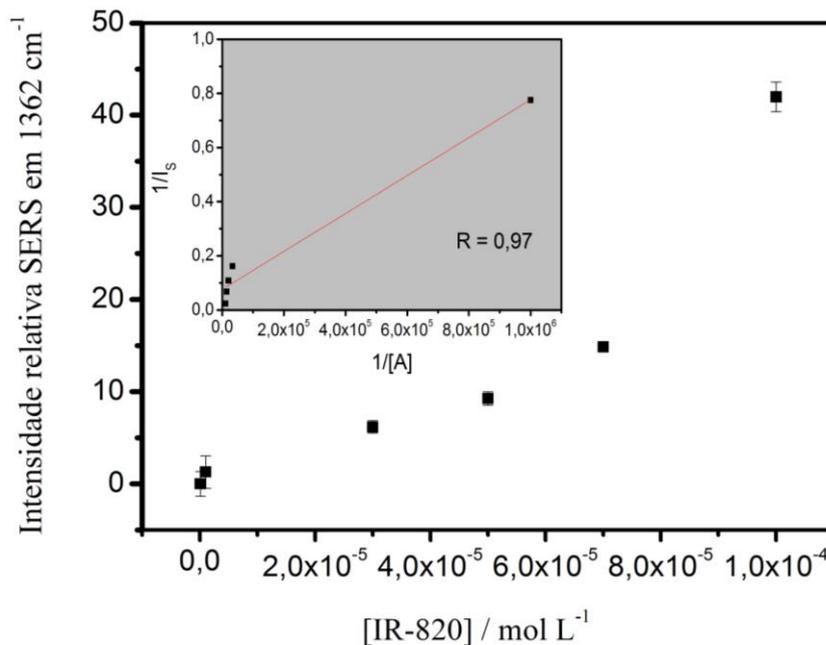
cm^{-1} . A média das cinco replicatas da intensidade relativa SERS das bandas a 1618 e 1360 cm^{-1} para o CV e IR-820, respectivamente, versus a concentração são plotados nas Figuras 31 e 32, respectivamente. A barra de erros em cada medida é dada pelo desvio padrão da média das intensidades medidas. É possível observar que a forma das curvas de intensidade SERS com a concentração para cada corante é diferente. Ambas as curvas podem ser identificadas como isotermas convexas, o que indica que a adsorção de ambos os corantes CV e IR-820 é favorável em AuNEs protegidas por Quit, com uma grande eficiência na adsorção apesar da baixa concentração em solução (ANDRADE *et al.*, 2012; KLEINMAN *et al.*, 2011).

Figura 31 – Ajuste de curva para Langmuir da adsorção do CV, usando a intensidade relativa SERS da banda em 1618 cm^{-1} . O gráfico no inserte mostra o ajuste linear do inverso da concentração molar de CV pelo inverso da intensidade relativa SERS.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 32 – Ajuste de curva para Langmuir da adsorção do IR-820, usando a intensidade relativa SERS da banda em 1362 cm^{-1} . O gráfico no inserto mostra o ajuste linear ao inverso da concentração molar de CV pelo inverso da intensidade relativa SERS.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Os dados nas Figuras 31 e 32 foram plotados de acordo com o modelo de adsorção de Langmuir. Os insertos nas Figuras 31 e 32 apresentam o plot de $1/I_s$ versus $1/[A]$ e, a partir do ajuste linear, foram obtidos os valores de K_{ad} e I_{sm} para o CV e o IR-820, que são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros de adsorção obtidos do ajuste de Langmuir para os resultados SERS do CV e IR-820 nas AuNEs protegidas por Quit.

Parâmetros	CV	IR-820
$K_{ad} (L \cdot mol^{-1})$	$4,02 \times 10^6$	$2,65 \times 10^5$
I_{sm}	$107,5 \pm 7,00$	$7,70 \pm 0,13$
$[Corante]_{max} (mol \cdot L^{-1})$	$1,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$
R^2	0,960	0,929

Fonte: Elaborado pela própria autora

É possível observar na Tabela 3 que os parâmetros de adsorção para o CV são mais altos quando comparados com os calculados para o IR-820, que é um resultado inesperado

considerando a carga positiva da Quit e negativa do IR-820. De fato, CV é um corante catiônico, e o IR-820 por ser um corante com uma carga positiva devido a um grupo N^+R_4 e duas negativas devido a dois grupos sulfonato em sua estrutura, possuindo carga total negativa. Assim, de acordo com sua carga total, o corante IR-820 teria uma tendência mais favorável para a interação eletrostática com a camada de Quit que protege as AuNEs, principalmente quando comparado com o CV, que é catiônico. Como a interação do CV com as AuNEs é mais favorável que do IR-820, como pode ser inferido pelos valores de K_{ad} , pode-se afirmar que a interação não é predominantemente eletrostática. Assim, a maior afinidade observada para o CV pode ser atribuída ao fato de o equilíbrio de adsorção ser mais provável pela interação direta do corante, atuando como base de Lewis, com a superfície das AuNEs, que atuaria como ácido de Lewis. Além disso, o CV apresenta a maior seção de choque Raman dentre os três corantes estudados quando excitado em 633 nm devido ao efeito do Raman Ressonante, que é responsável pela alta intensidade SERS deste corante.

5 CONCLUSÕES

Através dos experimentos realizados nesse trabalho foi possível caracterizar as AuNEs sintetizadas e os corantes CV, R6G e IR820, por espectroscopia no UV-VIS, e especificamente a caracterização das AuNEs foi complementada por MEV, comprovando a formação das nanoestruturas.

Também foi possível observar que o biopolímero Quit apresentou um grande potencial para ser utilizado em suspensões coloidais como protetor superficial, aumentando a estabilidade das AuNEs em suspensão. O que torna viável a sua utilização no controle da formação de *hot spots* entre as AuNEs.

Nos estudos iniciais para observar se a Quit ofereceria uma melhor estabilidade às AuNEs, estas foram colocadas em repouso por um período de 6 dias à temperatura ambiente, quando protegidas pelo biopolímero, sem que agregação ou precipitação das AuNEs fosse observada. A grande estabilidade dada pelo biopolímero foi também comprovada com os estudos voltados a indução da agregação das AuNEs pelos agentes agregantes KCl e EtOH. Quando as AuNEs estavam recobertas pelo biopolímero Quit, a diminuição da banda LSPR nas diferentes concentrações destes agentes agregantes foi bem menos significativa do que quando as AuNEs estavam sem a proteção superficial, agregando rapidamente após a adição dos agentes agregantes.

A presença de uma molécula de interesse na suspensão coloidal pode influenciar na banda LSPR característica da nanoestrutura, podendo levar à formação de agregados ou até mesmo à precipitação do coloide. Pelos resultados UV-VIS das AuNEs sem proteção superficial, esta agregação foi observada pelo aparecimento de novas bandas no espectro para maiores comprimentos de onda. Observou-se também que, na presença de duas moléculas de corantes distintos em solução, pode ser vista a influência de cada analito, com bandas SERS características da absorção de cada corante. Na presença de Quit essa modificação espectral foi controlada, apresentando pequenos deslocamentos da banda LSPR.

Pelas medidas do SERS, observou-se que na presença de dois corantes em suspensão é possível observar que as bandas características de cada composto são retratadas no mesmo espectro, ou seja, não ocorreu uma seletividade das moléculas disponíveis ao adsorverem na superfície metálica, tanto na presença quanto ausência do biopolímero Quit. O que indica que os *hot spots* ficaram disponíveis para ambos os corantes em suspensão, mas a intensidade do sinal SERS diminuiu significativamente quando na presença da Quit. A modulação e

estabilidade na formação dos *hot spots* também foram confirmadas pelas medidas espectroscópicas do sinal SERS da R6G.

Ao fazer a agregação de AuNEs com KCl e só então revestido por Quit e adicionando R6G, o sinal SERS diminui significativamente comparado com as AuNEs não revestidas por Quit. Esta análise sugere um possível congelamento de *hot spots* pela Quit. Esse resultado sugere a possibilidade de controlar a formação de *hot spots* quando as AuNEs são revestidos por Quit.

Com o controle na agregação e possível formação dos *hot spots*, as AuNEs protegidas por Quit permitiram estudar a adsorção de corantes sem agregação independente da concentração e da carga do corante. Como não houve agregação na presença dos corantes, foi possível construir isotermas de adsorção para o CV e IR-820 utilizando as AuNEs como substrato para o SERS, e os dados de equilíbrio de adsorção foram estimados. A possibilidade de realizar estudos de equilíbrio de adsorção de moléculas em AuNEs por espectroscopia SERS, com a construção de isotermas de adsorção é promissora pela alta sensibilidade do efeito SERS, sendo que a proteção superficial para garantir estabilidade das AuNEs pode ser desempenhado pela Quit. Essa proteção superficial oferece maior certeza de que a variação do sinal SERS vem unicamente da concentração do analito e não da agregação das AuNEs. Isso, aliado à possível utilização da Quit em sistemas biológicos pela sua não toxicidade, torna essa abordagem interessante para o futuro desenvolvimento de biossensores utilizando o SERS como uma técnica analítica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AILI, D. *et al.* Colorimetric protein sensing by controlled assembly of gold nanoparticles functionalized with synthetic receptors. **Small** v. 5, n. 21, p. 2445–2452 , 2009.
- ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J.A. Anomalously intense Raman -spectra of pyridine at a silver electrode. **Journal of the American Chemical Society** v. 99, n. 15, p. 5215–5217 , 1977.
- ALVES, A. P. P. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering study of the adsorption of croconate violet on colloidal silver particles. **Vibrational Spectroscopy** v. 64, p. 153–157 , 2013.
- ANDRADE, G. F. S. *et al.* Surface-enhanced resonance Raman scattering on gold concentric rings: Polarization dependence and intensity fluctuations. **Journal of Physical Chemistry C** v. 116, n. 4, p. 2672–2676 , 2012.
- ANKER, J. N. *et al.* Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature Materials** v. 7, n. June, p. 442–453 , 2008.
- AROCA, R. F. **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**. New York: Jonh Wiley & Son: [s.n.], 2006.
- ARORA, P. *et al.* Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. **Biosensors and Bioelectronics** v. 28, n. 1, p. 1–12 , out. 2011.
- BARALDI, G. *et al.* Probing Plasmonic Effects on the Raman Activity of Ag Nanoparticle-Based Nanostructures through Terphenyl Diisocyanide Adsorption. **The Journal of Physical Chemistry C** v. 118, n. 9, p. 4680–4686 , 6 mar. 2014.
- BARBOSA, L. C. de A. **Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos**. 1. ed. Viçosa, MG: [s.n.], 2007. 189 p.
- BARNES, W. L; DEREUX, A.; EBBESEN, T. W. Surface plamons subwavelength optics. **Nature** v. 424, n. August, p. 824–830 , 2003.
- BARROS, F. C. F. *et al.* Produção e caracterização de esfera de quitosana modificada quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímero** v. 7, n. 4, p. 232–246 , 2006.
- BEZERRA, A. M. Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** p. 1–72 , 2011.
- BORGHEI, Y. *et al.* Visual detection of cancer cells by colorimetric aptasensor based on aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization. **Analytica Chimica Acta** v. 904, p. 92–97 , 2016.
- BROLO, A. G. *et al.* Enhanced Fluorescence from Arrays of Nanoholes in a Gold Film. **J. Am. Chem. Soc.** v. 127, p. 14936–14941 , 2005.
- BROLO, A. G. Plasmonics for future biosensors. **Nature Photonics** v. 6, n. November, p. 709–713 , 2012.

CARVALHO, D. F. de. **Estudo da interação de biomoléculas com superfícies metálicas por espectroscopia SERS**. Programa de Pós-Graduação em Química, UFJF, Universidade Federal de Juiz de Fora, JF, 2012. 137 p.

CHADHA, R. *et al.* Effect of SDS concentration on colloidal suspensions of Ag and Au nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular** v. 150, p. 664–670, 2015.

CHANANA, M.; LIZ-MARZÁN, L. Coating matters: the influence of coating materials on the optical properties of gold nanoparticles. **Nanophotonics** v. 1, n. 3–4, p. 199–220, 1 jan. 2012.

CHEN *et al.* Quaternized chitosan / silver nanoparticles composite as a SERS substrate for detecting triclyclazole and Sudan I. **Applied Surface Science** v. 351, p. 466–473, 2015.

CHEN *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy toward application in plasmonic photocatalysis on metal nanostructures. “**Journal of Photochemistry & Photobiology, C: Photochemistry Reviews**” v. 21, p. 54–80, 2014.

CHEN, Y. *et al.* Colorimetric Detection of Lysozyme Based on Electrostatic Interaction with Human Serum Albumin-Modified Gold Nanoparticles. **Langmuir** v. 24, n. 10, p. 3654–3660, 2008.

CHENE, G. *et al.* Vers un dépistage possible du cancer de l'ovaire? Early detection of ovarian cancer: Tomorrow? A review. **Journal de Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction** p. 1–7, 2012.

COLLADO-GONZÁLEZ, M. *et al.* Aggregation behaviour of gold nanoparticles in presence of chitosan. **J Nanopart Res** v. 268, n. 17, p. 9–10, 2015.

CRUZ JUNIOR, O. F. **Produção de carvão ativado a partir de produtos residuais de espécies nativas da região amazônica**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba, Manaus, 2010. 75 p.

CUNHA, P. L. da; PAULA, R. C. M. de; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova** v. 32, n. 3, p. 649–660, 2009.

CUSSLER, E. L. **Diffusion: mass transfer in fluid systems**. 2. ed. Cambridge; New York: [s.n.], 1997. 580 p.

DAVIS, P. H. *et al.* Synthesis and Stabilization of Colloidal Gold Nanoparticle Suspensions for SERS. In: SOCIETY, American Chemical (Org.). . **In Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization**. Washington, DC, [s.n.], 2008. p. 16–30.

DE OLIVEIRA, D. G. *et al.* Chitosan-based improved stability of gold nanoparticles for the study of adsorption of dyes using SERS. **Vibrational Spectroscopy** v. 87, p. 8–13, 2016.

DEL PUERTO, E. *et al.* Adsorption Study and Detection of the High Performance Organic Pigments Quinacridone and 2,9-Dimethylquinacridone on Ag Nanoparticles By Surface-Enhanced Optical Spectroscopy. **Langmuir** v. 30, n. 3, p. 753–761, 28 jan. 2014.

DOYEN, M. *et al.* Amino acid induced fractal aggregation of gold nanoparticles : Why and how. **Journal of colloid and interface science** v. 464, p. 160–166 , 2016.

DUAN, R. *et al.* Chitosan-coated Gold Nanorods for Cancer Therapy Combining Chemical and Photothermal Effects. **Macromolecular Bioscience** v. 14, n. 8, p. 1160–1169 , 2014.

DUTTA, A. *et al.* Kinetics of reaction of gold nanoparticles following partial removal of stabilizers. **Journal of Nanoparticle Research** v. 17, n. 6, p. 260, 2015.

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 Author links open overlay panel. **Analytica Chimica Acta** v. 693, n. 1–2, p. 7–25 , 2011.

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

FILGUEIRAS, A. L. **Adsorção de antibióticos em superfícies de nanopartículas de ouro ou prata e suas interações in vitro com filmes biológicos.** Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017. 1-161 p.

FILGUEIRAS, A. L. **Estudo in vitro do potencial antibacteriano de nanopartículas de prata , associadas à quitosana e antibióticos e das interações com a superfície metálica por espectroscopia Raman intensificada por superfície associadas à quitosana e antibióticos e das int.** Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013. 1-115 p.

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.

FONSECA, B. G. da. **Estudo da interação entre Peptídeos Derivados de Triptofano e Nanopartículas Metálicas.** Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016. 117 p.

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. **Nature Physical Science** v. 241, p. 20–22 , 1973.

GAMBINOSSI, F.; MYLON, S. E; FERRI, J. K. Aggregation kinetics and colloidal stability of functionalized nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science** v. 222, p. 332–349, 2015.

GARABAGIU, S.; PESTEAN, C.; STEFAN, R. In vivo fluorescence studies of whole blood after chitosan bio-functionalized gold nanorods administration. **Journal of Luminescence** v. 143, p. 271–274, 2013.

HAN, X. *et al.* Role of Salt in the Spontaneous Assembly of Charged Gold Nanoparticles in Ethanol. **Langmuir** v. 27, p. 5282–5289, 2011.

HILDEBRANDT, P.; STOCKBURGER, M. Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of Rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver. **The Journal of Physical Chemistry** v. 88, n. 24, p. 5935–5944, 1984.

HUANG, S. *et al.* Optical spectroscopic studies of the dispersibility of gold nanoparticle solutions. **Journal of Applied Physics** v. 92, n. 12, p. 7486–7490 , 2002.

IZQUIERDO-LORENZO, I.; SANCHEZ-CORTES, S.; GARCIA-RAMOS, J. V. Adsorption of Beta-Adrenergic Agonists Used in Sport Doping on Metal Nanoparticles : A Detection Study Based on Surface-Enhanced Raman Scattering. **Langmuir Article** v. 26, n. 18, p. 14663–14670, 2010.

IZQUIERDO-LORENZO, I. *et al.* Adsorption and Detection of Sport Doping Drugs on Metallic Plasmonic Nanoparticles of Different Morphology. **Langmuir** v. 28, p. 8891–8901, 2012.

JEANMAIRE, D. L.; VANDUYNE, R. P. Surface Raman Spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic-amines Adsorbed on Anodized Silver Electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry** v. 84, n. 1, p. 1–20, 1977.

JIANG, Shan *et al.* Surface-functionalized nanoparticles for biosensing and imaging-guided therapeutics. **Nanoscale** v. 5, n. 8, p. 3127, 2013.

KAHLOW, S. **Pirolise de polipropileno pós-consumo visando a obtenção de novos produtos.** Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Curitiba, PR, 2007.

KENDALL, R. J. *et al.* **Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons.** 6th ed. ed. MacGraw-Hill, New York: [s.n.], 2001. cap. 28 p.

KLEINMAN, S. L. *et al.* Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Crystal Violet Isotopologues : Theory and Experiment. v. 133, p. 4115–4122 , 2011.

KUMAR, V. V.; ANTHONY, S. P. AuNP based selective colorimetric sensor for cysteine at a wide pH range: investigation of capping molecule structure on the colorimetric sensing and catalytic properties. **RSC Adv.** v. 4, n. 35, p. 18467–18472, 2014.

LAUS, R. *et al.* Reduction of acidity and removal of metal ions from coal mining effluents using chitosan microspheres. **Journal of Hazardous Materials** v. 149, n. 2, p. 471–474, out. 2007.

LE RU, E. C. *et al.* Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. **The Journal of Physical Chemistry C** v. 111, n. 37, p. 13794–13803, 23 set. 2007.

LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects.** 1st ed ed. Amsterdam: [s.n.], 2009. .

LE RU, E.; ETCHEGOIN, P. G. Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects. **Elsevier: Amsterdam** n. 1 st, p. 2009, 2009.

LI, W.; LI, X.; YU, N. Surface-enhanced resonance hyper-Raman scattering and surface-enhanced resonance Raman scattering of dyes adsorbed on silver electrode and silver colloid: a comparison study. **Chemical Physics Letters** v. 312, n. October, p. 28–36, 1999.

LIAO, J. *et al.* Linear aggregation of gold nanoparticles in ethanol. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects** v. 223, p. 177–183, 2003.

LIU, X. *et al.* Thermoresponsive gold nanoparticles with adjustable lower critical solution

temperature as colorimetric sensors for temperature, pH and salt concentration. **J. Mater. Chem.** v. 20, n. 2, p. 278–284, 2010.

LOU, C. W. *et al.* Antimicrobial activity of UV-induced chitosan capped silver nanoparticles. **Materials Letters** v. 128, p. 248–252, 2014.

MATTHEWS, Q. *et al.* Raman spectroscopy of single human tumour cells exposed to ionizing radiation in vitro. **Phys. Med. Biol.** v. 56, p. 19–38, 2011.

MAYER, K. M.; HAFNER, J. H.; ANTIGEN, A. Localized surface plasmon resonance sensors. **Chemical Reviews** v. 111, n. 6, p. 3828–3857, 2011.

MCNAY, G. *et al.* Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. **Applied Spectroscopy** v. 65, n. 8, p. 825–837, 1 ago. 2011.

MEDLEY, C. D. *et al.* Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Assay for the Direct Detection of Cancerous Cells. **Analytical Chemistry** v. 80, n. 4, p. 1067–1072, fev. 2008.

MONTEIRO, J. P. *et al.* Microfluidic Plasmonic Biosensor for Breast Cancer Antigen Detection. **Plasmonics** v. 11, p. 45–51, 2016.

MOSKOVITS, M. Surface-enhanced spectroscopy. **Reviews of Modern Physics** v. 57, n. 3, p. 783–826, 1985.

MURRAY, W. A.; BARNES, W. L. Plasmonic Materials. **Advanced Materials** v. 19, n. 22, p. 3771–3782, 19 nov. 2007.

NEVES, Tatiana B V; ANDRADE, Gustavo F S. SERS characterization of the indocyanine-type dye IR-820 on gold and silver nanoparticles in the near infrared. **Journal of Spectroscopy** v. 2015, p. 1–9, 2015.

NIE, S.; EMORY, Steven R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. **Science** v. 275, n. 21, p. 1102–1106, 1997.

NIKOBAKHT, B.; EL-SAYED, M. A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. **Chemistry of Materials** v. 15, n. 10, p. 1957–1962, 2003.

NUNES, D. L. **Preparação de carvão ativado a partir de torta prensada de *Raphanus sativus* L. e utilização para clarificação de soluções.** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. 117 p.

POTARA, M. *et al.* Chitosan-coated anisotropic silver nanoparticles as a SERS substrate for single-molecule detection. **Nanotechnology** v. 23, p. 1–11, 2012.

POTARA, M.; GABUDEAN, A.; ASTILEAN, S. Solution-phase, dual LSPR-SERS plasmonic sensors of high sensitivity and stability based on chitosan-coated anisotropic silver nanoparticles. **J. Mater. Chem.** v. 21, p. 3625–3633, 2011.

PRADO, A. G. S. *et al.* Comparative adsorption studies of indigo carmine dye on chitin and chitosan. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 277, n. 1, p. 43–47, set. 2004.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A New Type of Secondary Radiation. **Nature** v. 121, n. 3048, p. 501–502, 31 mar. 1928.

RIVAS, L. *et al.* Adsorption of acridine drugs on silver: surface-enhanced resonance Raman evidence of the existence of different adsorption sites. **Vibrational Spectroscopy** v. 25, n. 1, p. 19–28, fev. 2001.

RODRIGUES, D C; ANDRADE, G. F S; TEMPERINI, M. L. A. SERS performance of gold nanotubes obtained by sputtering onto polycarbonate track-etched membranes. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v. 15, p. 1169–1176, 2013.

RONCO, A.; SOBRERO, C.; ROSSINI, G. B. Conceptos Generales. In: CASTILLO MORALES, Gabriela (Org.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**. 1 ed ed. La Plata, Argentina.: [s.n.], 2004. p. 17–22.

RUBIM, J. C. *et al.* Contribution of Resonance Raman Scattering to the Surface-Enhanced Raman Effect on Electrode Surfaces. A Description Using the Time Dependent Formalism. **The Journal of Physical Chemistry** v. 99, n. 43, p. 15765–15774, out. 1995.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** v. 3, n. 1, p. 20–31, mar. 2007.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. São Paulo:Unesp: [s.n.], 2008. 276 p.

SÁNCHEZ-CORTÉS, S. *et al.* pH-Dependent Adsorption of Fractionated Peat Humic Substances on Different Silver Colloids Studied by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 198, n. 2, p. 308–318, fev. 1998.

SÁNCHEZ-CORTÉS, S; GARCÍA-RAMOS, J.V. Photoinduced coupling and adsorption of caffeic acid on silver surface studied by surface-enhanced Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** v. 55, n. 14, p. 2935–2941, dez. 1999.

SANT'ANA, A. C. **Caracterização do ácido esquárico e materiais derivados por espectroscopia Raman intensificada (uso de substratos metálicos SERS de alto desempenho)**. Instituto de Química, USP, São Paulo, 2005. 141 p.

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

SANTOS, P. B. **Estudo da fotodegradação no visível do corante Reactive Black 5 por catalisadores plasmônicos híbridos Ag/ZnO e Cu/ZnO**. UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016. 101 p.

SCHNEIDER, E. L. **Adsorção de compostos fenólicos sobre carvão ativado**. Centro de Engenharias e Ciências Exatas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008. 93 p.

SENGANI, M.; GRUMEZESCU, A. M.; RAJESWARI, V. D. Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis – A prospective review on drug delivery aspect.

OpenNano v. 2, n. July, p. 37–46, 2017.

SEVILLA, P. *et al.* Concentration-Controlled Formation of Myoglobin/Gold Nanosphere Aggregates. **The Journal of Physical Chemistry B** v. 118, n. 19, p. 5082–5092, 15 maio 2014.

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

SHAW, I.; CHADWICK, J. **Principles of Environmental Toxicology**. Philadelphia: [s.n.], 1998. 216 p.

SOKOLOV, S. V. ; KATELHON, Enno; COMPTON, Richard G. A Thermodynamic View of Agglomeration. **Journal of Physical Chemistry C** v. 119, n. 44, p. 25093–25099, 2015.

SUGUNAN, A. *et al.* Heavy-metal ion sensors using chitosan-capped gold nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials** v. 6, n. 3–4 SPEC. ISS., p. 335–340, 2005.

SUN, I. *et al.* Biocompatible Glycol Chitosan-Coated Gold Nanoparticles for Tumor-Targeting CT Imaging. **Pharmaceutical Research** v. 31, p. 1418–1425, 2014.

TRIPATHI, R. M.; SHRIVASTAV, A.; SHRIVASTAV, B. R. Biogenic gold nanoparticles: As a potential candidate for brain tumor directed drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology** v. 43, n. 5, p. 311–317, 3 set. 2015.

TSUTSUI, G. *et al.* Well-size-controlled Colloidal Gold Nanoparticles Dispersed in Organic Solvents. **Jpn. J. Appl. Phys** v. 40, n. 1, p. 346–349, 2001.

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

VASCONCELOS, H. L. *et al.* Chitosan modified with Reactive Blue 2 dye on adsorption equilibrium of Cu(II) and Ni(II) ions. **Reactive and Functional Polymers** v. 67, n. 10, p. 1052–1060, out. 2007.

VEISEH, O.; GUNN, J. W; ZHANG, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 62, n. 3, p. 284–304, 2010.

WEI, J. *et al.* Analysis of Influenza Virus Receptor Specificity Using Glycan-Functionalized Gold Nanoparticles. **ACS Nano** v. 8, n. 5, p. 4600–4607, 27 maio 2014.

WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemistry** v. 58, n. 1, p. 267–297, maio 2007.

YE, Y. *et al.* Colorimetric sensing of copper ions based on the anti-aggregation of unmodified silver nanoparticles in the presence of 1,4-dithiothreitol. **Analytical Methods** v. 7, n. 2, p. 566–572, 2015.

ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews** v. 257, n. 3–4, p. 638–665, 2013.0010-8545.

APÊNDICE

1 PERSPECTIVAS FUTURAS

1.1 ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE NANOBASTÕES DE Au COM O BIOPOLÍMERO QUITOSANA COMO PROTETOR SUPERFICIAL

Para ampliar os estudos de modulação dos *hot spot*, também foram realizados estudos iniciais de proteção superficial e estabilidade de nanobastões de ouro (AuNRs) utilizando a Quit como protetor superficial. Para melhor compreender esta interação, estes também foram realizados utilizando as técnicas de espectroscopia no UV-VIS e o efeito SERS, nas mesmas condições experimentais utilizadas neste trabalho para as AuNEs. A única diferença foi a necessidade da centrifugação dos AuNRs para a retirada do excesso do surfactante CTAB utilizado na síntese dos AuNRs e que ficam em excesso na suspensão coloidal. As moléculas para obtenção do sinal SERS também foram os corantes: CV, R6G e IR-820. Para a síntese dos AuNRs foi utilizado o procedimento dos autores Nikoobakht e El-Sayed, já conhecida em literatura (NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003).

Não foi possível finalizar estes estudos no presente trabalho, mas foi possível obter alguns resultados experimentais, e os espectros obtidos encontram-se disponíveis no ANEXO 1. Estes resultados então, ficam disponíveis para o grupo de estudantes do LabNano, sendo possível dar seguimento aos estudos para melhor entender a interação Quit com os AuNRs, e assim aplicar aos possíveis estudos de equilíbrio de adsorção e construção de isotermas para moléculas específicas.

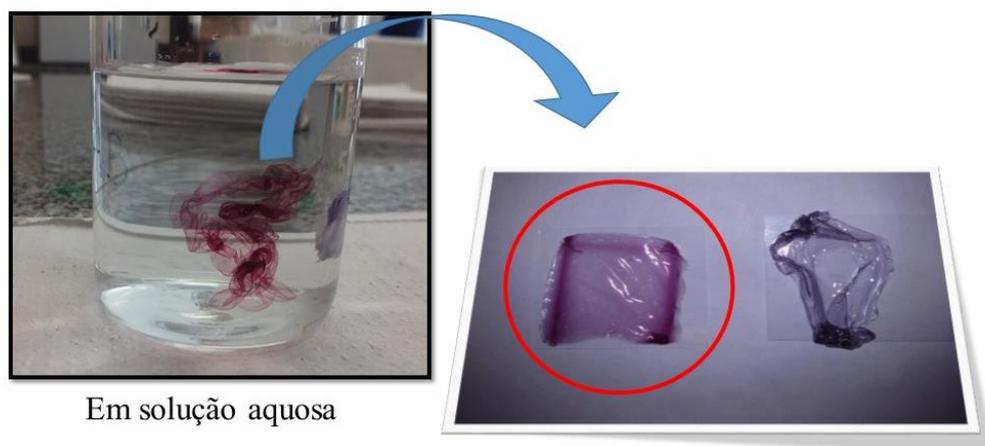
1.2 CONSTRUÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM AuNEs

Visto a estabilidade e proteção superficial que a Quit pode proporcionar às AuNEs, iniciou-se a tentativa de produzir filmes de Quit com AuNEs inseridas. Esses tipos de filmes podem ser aplicados como um substrato para biossensor quando modificados com marcadores específicos, através de interações químicas que podem ser monitoradas por SERS e mudança na banda LSPR.

Testes iniciais para a padronização de um filme resistente foram realizados. Caracterizações desse filme ainda são necessárias, além de estudos para a modificação superficial e possível aplicação. Para a construção do filme, Figura 33; 2,0 mL de AuNEs foram centrifugadas à 14000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, e 500,0 μL de H_2O deionizada foram adicionadas. Posteriormente foram acrescentados 1,0 mL de Quit 10,0 g L^{-1} . Esse material foi levado para agitação em vortex por

15 minutos. Após agitação o material foi colocado em suporte de plástico e levado à estufa a vácuo em temperatura ambiente por 12 horas para secagem. Após os filmes secos, foi feito um teste simples colocando-o em um béquer com água para observar a sua solubilidade.

Figura 33 – Testes iniciais para a construção de filmes de Quit com AuNEs e sua solubilidade em solução aquosa.



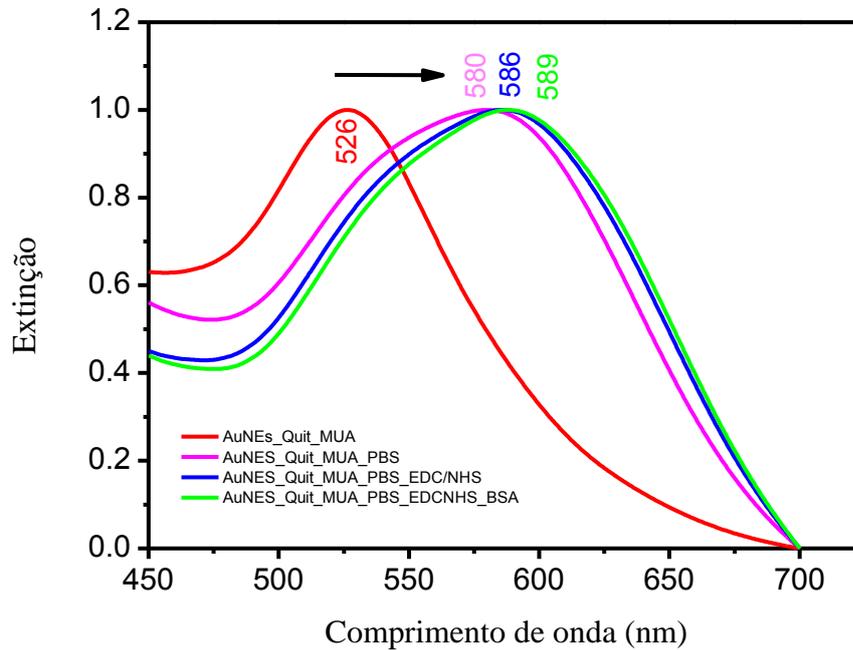
Fonte: Elaborado pela própria autora

1.3 IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS EM AuNEs MODIFICADAS

Estudos iniciais para a imobilização de proteínas nas superfícies das AuNEs também já estão sendo desenvolvidos. Para os testes iniciais foi utilizado a albumina de soro bovino (BSA do inglês, *bovine serum albumin*), que é uma proteína simples e pode ser utilizada como modelo para estudo da interação de proteína com AuNPs de formas variadas.

Os testes iniciais de imobilização foram realizados, até o momento, com o substrato de AuNEs protegidas superficialmente por Quit. Após o processo de imobilização de Quit, é adicionado o corante, que será a molécula prova no SERS. Todas as modificações estão sendo acompanhadas por UV-VIS, com ciclos de centrifugação para a retirada do excesso de componente adicionado. A seguir temos um teste inicial com a imobilização de $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} de ácido mercaptoundecanóico (MUA) e (0,05/0,1 mol L^{-1}) de N-etil N-(3 dietilaminopropil) carbodiimida / N-hidroxisuccinimida, conhecido por EDC/NHS, seguido da proteína BSA na concentração 1,0 mg mL^{-1} . É possível já observar alguns resultados em mudanças no espectro UV-VIS na banda LSPR do coloide, além da estabilidade deste confirmada, Figura 34.

Figura 34 – Modificação superficial de AuNEs com a imobilização da proteína BSA.



Fonte: Elaborado pela própria autora

1.4 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE DAS AuNEs COM E SEM PROTEÇÃO SUPERFICIAL POR QUITOSANA

Outra perspectiva é o início de um projeto que pode ser denominado: “Estudo ecotoxicológico de AgNEs e AuNEs com e sem recobrimento pelo biopolímero Quit”. A ecotoxicologia é uma área específica da toxicologia ambiental que estuda os efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos (KENDALL, 2001; RONCO; SOBRERO; ROSSINI, 2004).

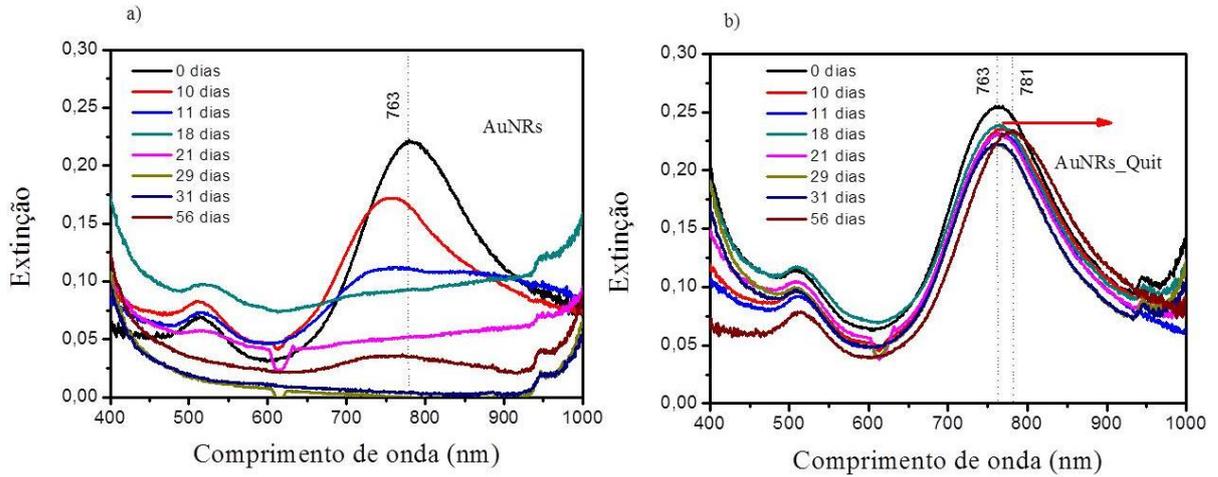
Nesse contexto, podemos utilizar os microcrustáceos de água doce em ensaios ecotoxicológicos (conhecidos como pulgas d’água), por serem importantes em muitas cadeias alimentares e fonte significativa de alimento para peixes, além de possuírem um ciclo de vida curto e de fácil cultivo em laboratório, e são sensíveis a vários contaminantes do ambiente aquático (SHAW; CHADWICK, 1998).

Tendo em vista a preocupação com os efeitos toxicológicos e ecotoxicológicos das AgNEs e AuNEs com e sem recobrimento superficial em diversas aplicações industriais e biológicas, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos ecotoxicológicos dessas AuNEs

com e sem recobrimento superficial por Quit, tanto em nível agudo quanto crônico, utilizando as espécies do gênero *Daphnia* e *Ceriodaphnia*. As AgNEs e AuNEs serão sintetizadas e recobertas superficialmente por Quit em parceria com Departamento de Química da UFJF no Laboratório de Nanoestruturas Plasmônicas – LabNano. Já os testes ecotoxicológicos serão realizados nas dependências da UEMG unidade Ubá.

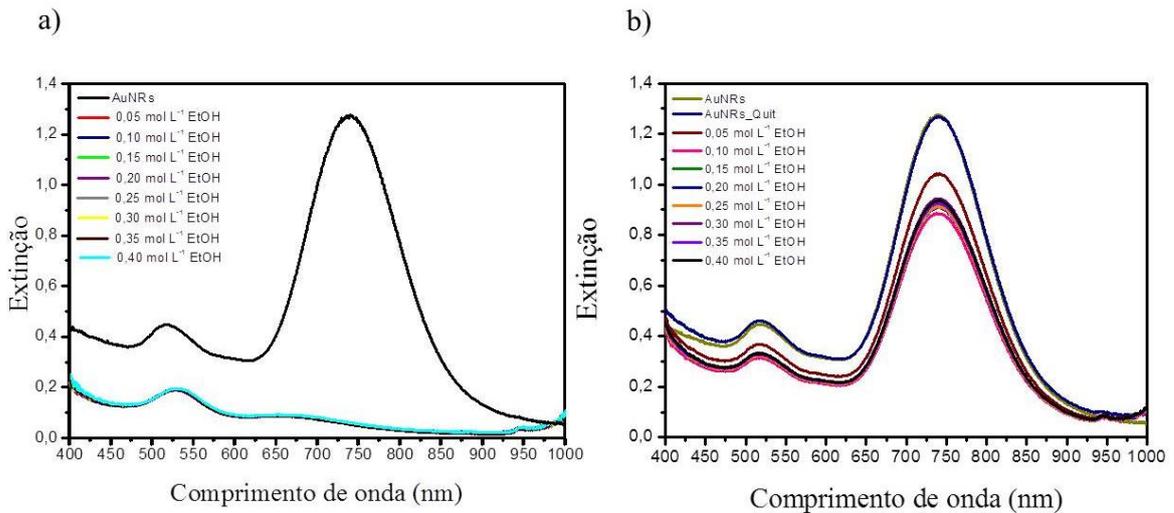
ANEXO 1

Figura 35 – Estabilidade dos AuNRs à temperatura ambiente: a) sem proteção superficial, b) com proteção superficial por Quit.



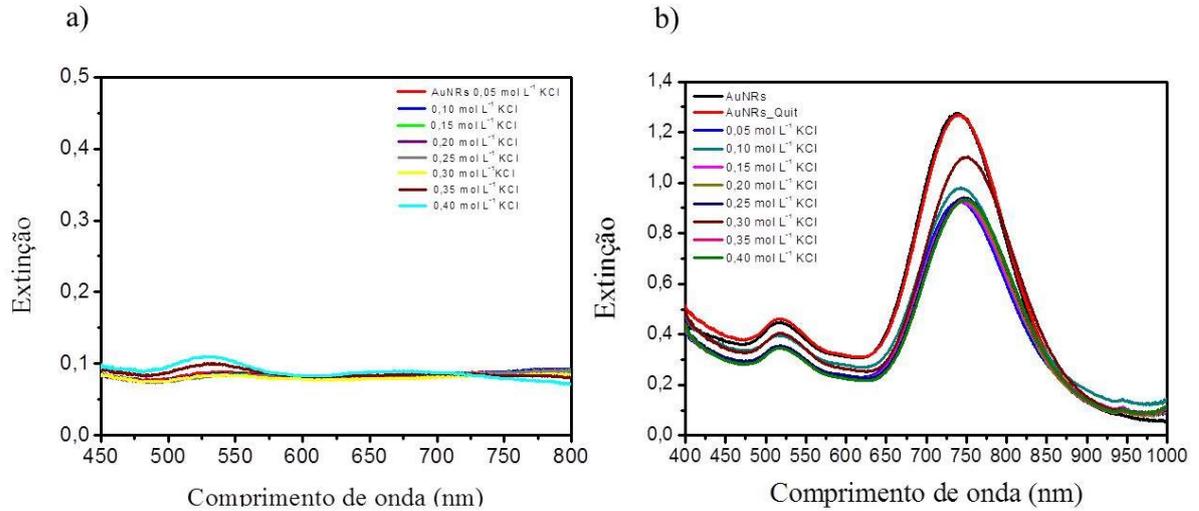
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 36 – Estudo por UV-VIS da agregação dos AuNRs induzido por etanol: a) sem proteção superficial por Quit; b) com proteção superficial por Quit 0,1 g L⁻¹.



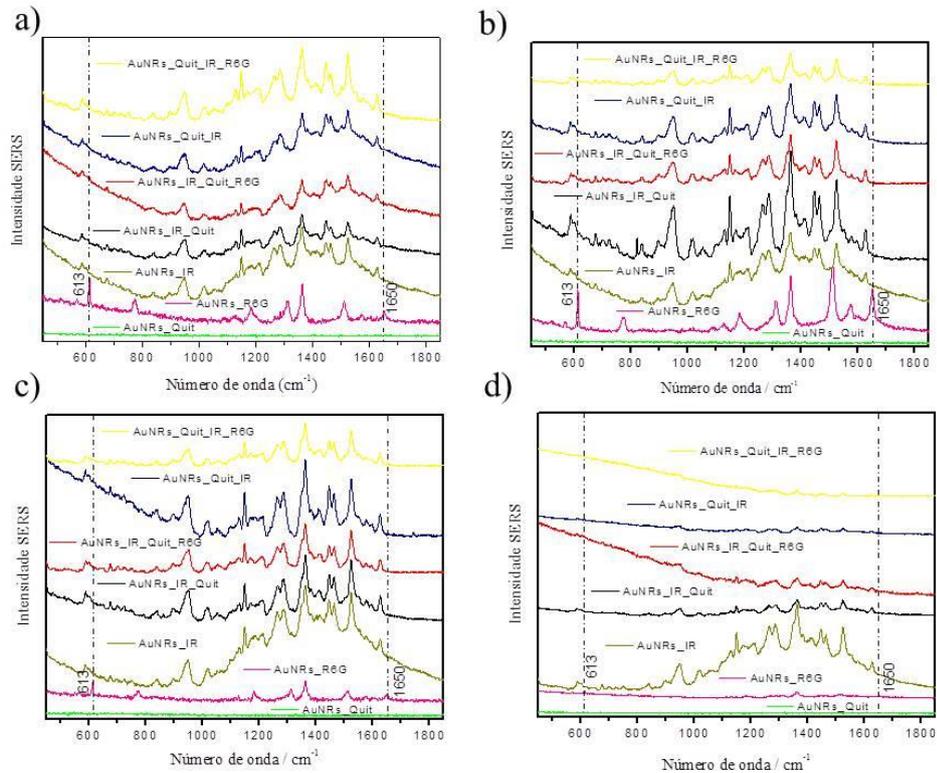
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 37 – Estudo por UV-VIS da agregação das AuNRs induzido por KCl: a) sem proteção superficial por Quit; b) com proteção superficial por Quit 0,1 g L⁻¹.



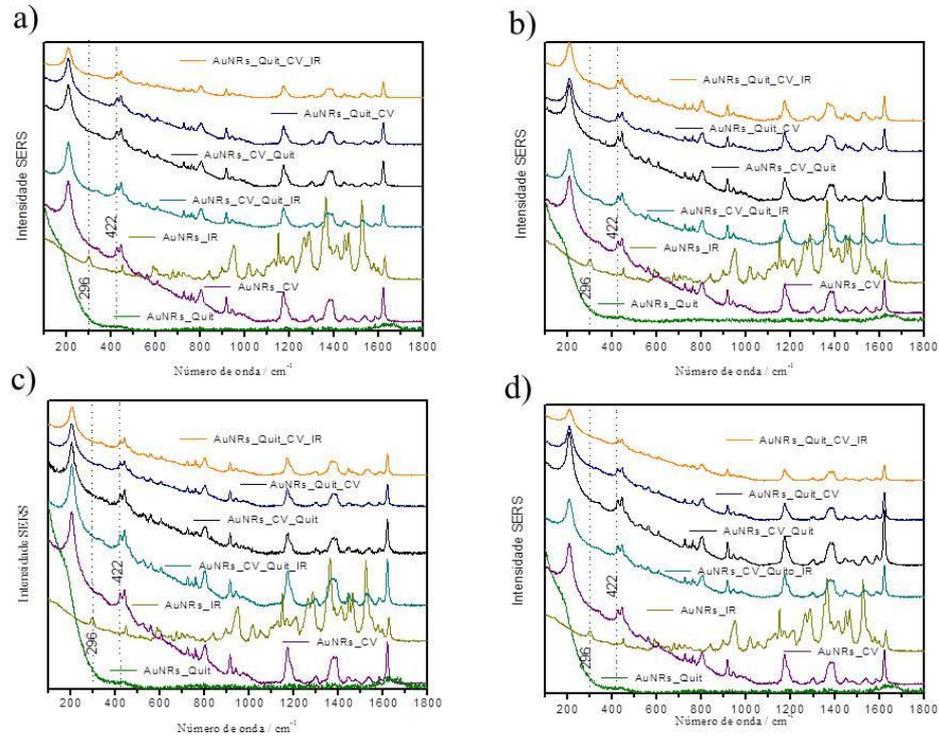
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 38 – SERS dos corantes IR-820 e catiônico R6G em AuNRs, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L⁻¹; b) 0,01 g L⁻¹; c) 0,1 g L⁻¹; d) 1,0 g L⁻¹.



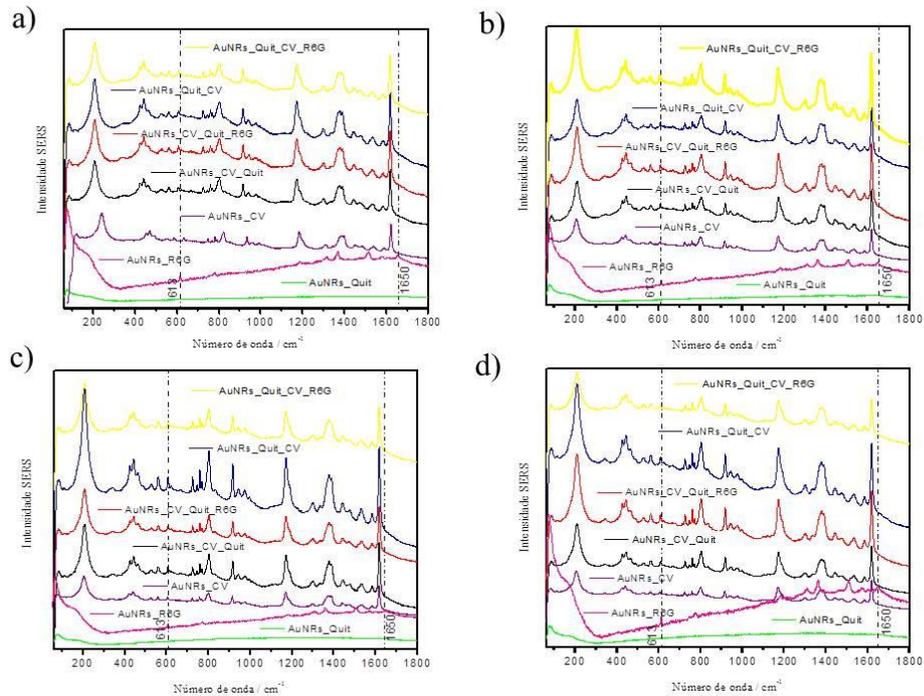
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 39 – SERS dos corantes CV e IR-820 em AuNRs, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L⁻¹; b) 0,01 g L⁻¹; c) 0,1 g L⁻¹; d) 1,0 g L⁻¹.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 40 – SERS dos corantes CV e R6G em AuNRs, com Quit como protetor superficial nas concentrações: a) 0,001 g L⁻¹; b) 0,01 g L⁻¹; c) 0,1 g L⁻¹; d) 1,0 g L⁻¹.



Fonte: Elaborado pela própria autora

ANEXO 2

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- *Artigos completos publicados em periódicos*

DE OLIVEIRA, DÉBORA G.; PEIXOTO, LINUS P.F.; SÁNCHEZ-CORTÉS, SANTIAGO; ANDRADE, GUSTAVO F.S. Chitosan-based improved stability of gold nanoparticles for the study of adsorption of dyes using SERS. *Vibrational Spectroscopy (Print)*, v. 87, p. 8-13, 2016.

- *Artigos completos em redação, a ser submetido em futuro próximo*

DE OLIVEIRA, DÉBORA G.; PIMENTEL, GIOVANA A.; ANDRADE, GUSTAVO F.S. Chitosan stabilization and control of *hot spot* formation and SERS performance for gold nanospheres.

- *Trabalhos completos publicados em anais de congressos*

OLIVEIRA, D. G.; MARQUES, F. C.; SENA, L. A.; ARCHANJO, B. S.; ANDRADE, G. F. S. Otimização de nanobastões de Au para o desenvolvimento de biossensores baseados em SERS. XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

PEIXOTO, L. P. F.; **OLIVEIRA, D. G.**; SENA, L. A.; ARCHANJO, B. S.; ANDRADE, G. F. S. Desenvolvimento de biossensores plasmônicos. Anais do VIII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, EMBRAPA GADO DE LEITE, Juiz de Fora – MG, 2014. v. 1. p. 25-580.

OLIVEIRA, D. G.; ANDRADE, G. F. S. Estudo da interação superficial de AuNRs com os corantes Cristal violeta, IR820 e Rodamina-6G utilizando quitosana como protetor superficial. IV EnBraER - Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, Juiz de Fora – MG, 2015.

OLIVEIRA, D. G.; OLIVEIRA, P. L.; SANTOS, P. B.; BRASIL, M. S. L.; FERNADES, R. F. ; NUNES, L. O. ; SANTANA, A. C.; SANCHEZ-CORTES, S.; ANDRADE, G. F. S. . Study of the interaction to 4-mercaptobenzoic acid with silver and gold nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). XXV International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2016), Fortaleza – Ceará, 2016.

OLIVEIRA, D. G.; PIMENTEL, G. A.; ANDRADE, G. F. S. Improved stability of gold nanospheres protected by chitosan in the presence of KCl and ethanol aggregating agents. XV Encontro da SBPMat, Campinas, 2016.

OLIVEIRA, D. G.; PEIXOTO, L. P. F.; SANCHEZ-CORTES, S.; ANDRADE, G. F. S. Improving the stability of gold nanoparticles by chitosan for the SERS study of adsorption of dyes. XV Encontro da SBPMat, Campinas, 2016.

PIMENTEL, G. A.; **OLIVEIRA, D. G.**; ANDRADE, G. F. S. THE ROLE OF CHITOSAN IN THE SERS PERFORMANCE OF GOLD NANOPARTICLES. 46th World Chemistry Congress, 40^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly, São Paulo – SP, 2017.