



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

INGRID BRITO BARBOSA

**SUBSTRATOS DE BOTRIOSFERANA E NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS PARA A ESPECTROSCOPIA RAMAN
INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE**

Londrina
2018

INGRID BRITO BARBOSA

**SUBSTRATOS DE BOTRIOSFERANA E NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS PARA A ESPECTROSCOPIA RAMAN
INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química, do Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato

Coorientador: Prof. Dr. Henrique de Santana

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

BARBOSA, INGRID BRITO BARBOSA.

SUBSTRATOS DE BOTRIOSFERANA E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE / INGRID BRITO BARBOSA BARBOSA. - Londrina, 2018.

111 f. : il.

Orientador: ALEXANDRE ORSATO ORSATO.

Coorientador: HENRIQUE DE SANTANA DE SANTANA.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Inclui bibliografia.

1. PREPARAÇÃO DE SUBSTRATOS QUE TEM COMO BASE FILMES BIOPOLIMÉRICOS COBERTOS COM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA A DETECÇÃO DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA PELA SUPERFÍCIE (SERS). - Tese. I. ORSATO, ALEXANDRE ORSATO. II. DE SANTANA, HENRIQUE DE SANTANA. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

INGRID BRITO BARBOSA

**SUBSTRATOS DE BOTRIOSFERANA E NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS PARA A ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA
POR SUPERFÍCIE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química, do Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Orgânica.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gizilene Carvalho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Jair Scarmínio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de abril de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Jailce e Diogo Barbosa. E à minha
irmã Lusânia Barbosa.

AGRADECIMENTO (S)

Agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida a quem tenho devoção em primeiro lugar, por toda força e pela companhia nessa jornada.

Aos meus pais Lupércio Diogo e Jailce Barbosa por todo o amor, compreensão e apoio em cada passo dado até aqui.

A minha amada irmã Lusânia Barbosa por nunca ter economizado na presença e na atenção mesmo de longe, sem falar do seu amor imenso.

Ao meu noivo Murilo Coutinho por ter abraçado mais essa etapa comigo e por ter passado a viver meus sonhos, minhas angustias, medos e alegrias.

Aos preciosos amigos que conquistei na minha graduação na UESC e se tornaram parte de minha vida e os que estão nela desde a infância, que mesmo de longe sempre torceram para o meu sucesso, em especial Isabelle Menezes, Thamires Soares, Felisberto Bruno, Matheus Costa, Claudia Melgaço, Aline Barreto, Edriana Dias, Percida Fonseca, Roberta Rocha, Bruna Bernardes, Ivon Lôbo, Sêmele Santos, Edielen França, M^a Elvira, Natália Barbosa, Bárbara Paula e Andrea Queiroz.

A Dayt Corsino e sua família, que mesmo sem me conhecer muito bem, me acolheu e me permitiu começar mais esse sonho, com muita generosidade, humildade e amor. E me mostrou que existem pessoas incríveis no mundo.

Ao meu orientador Alexandre Orsato que aceitou o compromisso de me orientar e me deu todo apoio nessa caminhada, em sabedoria, organização e conhecimento.

Ao meu co-Orientador Henrique de Santana que contribuiu imensamente com sua experiência, paciência e conhecimento para a construção desse projeto.

A Aline Batista que se disponibilizou em muitos dias com sua paciência e bondade e contribuiu de forma direta para a finalização desse trabalho realizando comprometidamente as análises de AFM e Raman.

Aos grandes amigos que conquistei durante o mestrado por terem me acolhido e partilhado um pouco da sua alegria e vida comigo. Em especial Leticia Magalhães, Marcela Breves, Bruce Alan, Cleiton Silvério, Débora Fernandes, Felipe Benatti, Jackson Falquembak, Sannah Santos, Simone Birkheur e Caroline Tonetti.

Aos companheiros de laboratório do LASMMED que fizeram dos

meus dias mais alegres para a tarefa árdua e persistente da pesquisa.

A professora Aneli Barbosa por ter sido uma colaboradora de extrema generosidade.

Ao professor Alexandre Urbano , por sua disponibilidade na realização das análises de DRX, por sua amizade e por dividir comigo tantos conhecimentos valiosos que foram cruciais para o desenvolvimento dos resultados desse trabalho.

Ao aluno de IC Thiago Machado (UTFPR) que se disponibilizou totalmente como colaborador nesse trabalho, junto ao professor Arandi Bezerra (UTFPR) disponibilizando generosamente todo material necessário na preparação dos substratos e foi crucial para que esse trabalho se tornasse algo tão especial para todos os envolvidos, principalmente para mim.

*“Por mais letrado que você seja, nunca deixe
de ouvir com outros olhos”*

(O Teatro Mágico)

BARBOSA, Ingrid Brito. **Substratos de botriosferana e nanopartículas metálicas para a espectroscopia raman intensificada por superfície**. 2018. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados da preparação, caracterização e aplicação de um substrato para SERS e utiliza como moléculas sonda a cisteína e o cristal violeta. O material tem como base um filme do polissacarídeo fúngico denominado botriosferana, coberto com uma fina camada de nanopartículas metálicas (NPMs). Nanopartículas de prata e ouro (NPAg e NPAu) foram utilizadas para a cobertura do polissacarídeo e foram produzidas pela técnica de ablação a laser, uma técnica limpa e rápida na produção de nanoestruturas de metais. A forma de deposição escolhida para formação do substrato foi a técnica de evaporação por solvente (*casting*). O substrato composto pelo polissacarídeo coberto com as nanopartículas metálicas teve sua superfície caracterizada, após a montagem, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), espectrometria no ultravioleta-visível (UV-vis) e espectroscopia Raman. A caracterização do coloide resultou em diâmetros predominantes de 5 nm e 1,2 nm para as NPAg e NPAu, respectivamente. A superfície do filme de polissacarídeo apresentou rugosidade de forma heterogênea ao longo do filme e diferentes espessuras, observadas pelas imagens de AFM. Os filmes cobertos com as nanopartículas de prata apresentaram banda de absorção (UV-vis) em 415 nm, característica de NPAg e homogeneidade com aglomerados de NPs aleatórios na superfície do polissacarídeo, observado por MEV. As duas moléculas analisadas se comportaram de formas distintas nos substratos preparados, sendo que a intensificação SERS no substrato com NPAg se mostrou promissora, pois alcançou a detecção dos dois analitos avaliados. O fator de intensificação (EF) obtido para o cristal violeta, mais satisfatório, alcançou 10^6 ordens de grandeza. Percebeu-se ainda a possibilidade de reutilização do substrato, visto que a retirada do analito ocorre após lavagens sucessivas com água, processo que foi monitorado pela intensidade dos sinais Raman do cristal violeta que foi diminuída a cada ciclo de lavagem.

Palavras-chave: SERS. Nanopartículas de prata e ouro. Botriosferana. Espectroscopia Raman. Ablação a laser.

BARBOSA, Ingrid Brito. **Substrates made of botryosphaeran and metallic nanoparticles for surface-enhanced raman spectroscopy.** 2018. 111 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

This work presents the results of the preparation, characterization and application of a substrate for SERS and uses as probe molecules cysteine and violet crystal. The material is based on a film of the fungal polysaccharide called botryosphaeran, covered with a thin layer of metallic nanoparticles (NPMs). Silver and gold nanoparticles (NPAg and NPAu) were used to cover the polysaccharide and were produced by the laser ablation technique, a clean and fast technique in the production of metal nanostructures. The deposition method chosen for substrate formation was the technique of solvent evaporation (casting). The substrate, composed by the polysaccharide covered with the metallic nanoparticles, had its surface characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), Ultraviolet-visible Spectrometry (UV-vis) and Raman Spectroscopy. The characterization of the colloid resulted in main diameters of 5 nm and 1.2 nm for NPAg and NPAu respectively. The surface of the polysaccharide film showed a heterogeneous roughness throughout the film and different thicknesses observed by AFM images. Films covered with the silver nanoparticles had an absorption band (UV-vis) at 415 nm characteristic of NPAg and homogeneity with random agglomerates of NPs on the surface, observed by SEM. The two analyzed molecules behaved differently in the substrates and the SERS enhancement in NPAg substrate showed to be promising since it reached the detection of the two probes analyzed. The enhancement factor (EF) obtained for violet crystal reached 10^6 orders of magnitude. We suggest that the substrate can be reused, since the removal of the analyte occurs after successive washes with water, a process that was monitored by the intensity of the raman signals of the violet crystal that was decreased after each washing cycle.

Key words: SERS. Gold and Silver Nanoparticles. Botryosphaeran. Raman Spectroscopy. Laser ablation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema representando a composição e estrutura de um substrato SERS utilizando biopolímero coberto com nanopartículas metálicas com o analito depositado na superfície	20
Figura 2 –	Fórmula estrutural do Cristal Violeta	21
Figura 3 –	Fórmula estrutural da molécula de cisteína	22
Figura 4 –	Tipos de espalhamentos decorrentes da luz incidente na técnica de espectroscopia Raman	25
Figura 5 –	Movimentação do Plasmon de ressonância com a luz incidente.....	27
Figura 6 –	Sistematização do mecanismo de transferência de carga mostrando a aproximação entre os orbitais de fronteira do adsorbato e os elétrons de Fermi da superfície das NPM	28
Figura 7 –	Influência do campo elétrico das diferentes formas de nanopartículas na detecção SERS da molécula de piridina.....	31
Figura 8 –	Instrumentação utilizada para o processo de ablação a laser. (A) Recipiente da amostra; (B) lâmina metálica (Au, Ag, Cu, etc.) (C) solvente (água ou orgânico); (D) garra suporte para a lâmina metálica; (E) lentes; (F) raio laser.....	34
Figura 9 –	Fórmula estrutural da botriosferana	37
Figura 10 –	Grupos utilizados como moléculas sonda ativas em SERS	39
Figura 11 –	Sistema utilizado para o processo de ablação a laser na confecção das nanopartículas metálicas	42
Figura 12 –	Filme de botriosferana (ao centro) em suporte de vidro.....	44
Figura 13 –	Filmes de Botriosferana coberto com NPAg e Cristal Violeta (retângulos ao centro das placas)	46
Figura 14 –	Espectro Raman do filme de botriosferana <i>in natura</i> sobre lâmina de vidro ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$).....	51
Figura 15 –	Espectros Ramando filme de botriosferana desproteïnizada sobre lâmina de vidro ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$).....	52
Figura 16 –	Espectro Raman da botriosferana sólida desproteïnizada ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$)	53

Figura 17 –	Imagens da AFM do filme de botriosferana	55
Figura 18 –	Gráfico da dispersão e diâmetro das NPAg analisadas por DLS	57
Figura 19 –	Gráfico da dispersão e diâmetro das NPAu analisadas por DLS	58
Figura 20 –	Espectro de absorção UV-vis do coloide de NPAg	59
Figura 21 –	Espectro de absorção UV-vis da solução de NPAu	60
Figura 22 –	Espectro Raman do filme de botriosferana coberto com NPAu (BNPAu) ($\lambda = 785 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$)	61
Figura 23 –	Espectros Raman da cisteína em diferentes concentrações na presença de solução coloidal de NPAu (cis NPAu) e sobre um filme de NPAu depositado sobre o vidro (cis 1% e cis 10%) ($\lambda = 785 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$)	62
Figura 24 -	Espectro Raman da cisteína sólida. ($\lambda = 785 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$)	63
Figura 25 –	Espectros SERS da cisteína em solução coloidal de nanopartículas de prata. No <i>insert</i> , espectro Raman da cisteína sólida ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$)	66
Figura 26 –	Espectro de absorção no UV-vis do filme de botriosferana coberto com NPAg sobreposto com o espectro UV-vis da solução coloidal de NPAg	68
Figura 27 –	Difratogramas de DRX dos filmes de botriosferana e BNPAg sobre superfície de vidro	69
Figura 28 –	Espectro SERS da cisteína (48 mg/cm^2) depositada no substrato de botriosferana coberto com NPAg (BNPAg Cis), comparado com o branco (BNPAg sem cisteína) ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 10 \text{ s}$)	71
Figura 29 –	Espectros SERS de cisteína no substrato BNPAg com diferentes quantidades de analito. (Cis48 = 48 mg/cm^2 ; Cis24 = 24 mg/cm^2 ; Cis12 = 12 mg/cm^2 ; Cis6 = 6 mg/cm^2	73
Figura 30 –	Espectros SERS de amostras de diferentes concentrações do cristal violeta (CV) em solução de NPAg ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$)	74
Figura 31 –	Espectro Raman da solução de cristal violeta (3 mmol.L^{-1}) ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$)	75

Figura 32 – Espectros SERS do CV em diferentes quantidades de massa sobre o BNPAg. ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$)	77
Figura 33 – Espectros SERS do CV sobre BNPAg ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$).....	81
Figura 34 – Espectros SERS do CV sobre BNPAg. ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$).....	82
Figura 35 – Espectros SERS do CV em SNPAg. ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$).....	83
Figura 36 – Espectros do CV em filme de botriosferana e sobre BNPAg (mCV = 0,02 μg) ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$).....	84
Figura 37 – Espectros SERS do branco BNPAg antes e após a incubação em estufa com outros substratos contendo o CV. ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$)	85
Figura 38 - Espectro SERS do cristal violeta à 0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$).....	86
Figura 39 – Espectros SERS de CV em BNPAg lavado em 3 etapas de 20 lavagens a cada 10s ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$)	87
Figura 40 – Espectro SERS do cristal violeta à 0,005 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$).....	88
Figura 41 – Espectro SERS do cristal violeta após o 3 ^o ciclo de lavagem (SLav 3)	89
Figura 42 – Imagens da MEV comparando o filme de botriosferana (A) com o substrato BNPAg (B)	90
Figura 43 – Imagem da MEV de diferentes áreas do BNPAg	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Atribuição das bandas do espectro Raman da Botriosferana	54
Tabela 2	–	Dados obtidos das análise de AFM em diferentes regiões do filme de botriosferana.....	56
Tabela 3	–	Atribuição das bandas do espectro Raman e SERS da cisteína em diferentes substratos.....	64
Tabela 4	–	Atribuição das bandas do espectro Raman e SERS do cristal violeta76	
Tabela 5	–	Massa de cristal violeta depositada no BNPAg.....	79
Tabela 6	–	Fator de Intensificação para o cristal violeta no substrato BNPAg	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
Ag ₃ PO ₄	Fosfato de prata
A _{laser}	Área do substrato que interage com o laser
BCV	solução de cristal violeta (branco)
BCV3mM	solução de cristal violeta (branco) com concentração de 3 mmol.L ⁻¹
BNPAgCis	Substrato de botriosferana com nanopartícula de prata e cisteína
BNPAgCV	cristal violeta depositado na superfície do substrato de botriosferana coberto com nanopartículas de prata
BNPAu	substrato de botriosferana coberto com nanopartículas de ouro
BotCV	filme de botriosferana com cristal violeta
Cis	cisteína
Cis 1%	cisteína no filme de nanopartículas de ouro com 1% em concentração
Cis 10%	cisteína no filme de nanopartícula de ouro com 10% em concentração
Cis NPAu	cisteína em solução de nanopartículas de ouro
Cis sólido	cisteína sólida
cm ⁻¹	número de onda em centímetros elevado a -1
CV	Cristal Violeta
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz
DRX	Difração de Raio-X
EF	Fator de Intensificação
ESPEC	Laboratório de Espectroscopia
FT-Raman	Espectroscopia Raman com transformada de Fourier
H ₂ S	ácido sulfídrico
I	ordem de grandeza da potência do laser que atinge a amostra
I	Estado intermediário
I ₀	Radiação Incidente
I _{bulk}	Área da banda de intensidade do espectro Raman normal
I _{SERS}	Área da banda de intensidade do espectro SERS
KH ₂ PO ₄	dihidrogenofosfato de potássio
LMEM	Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
n/cm ²	número de moléculas por área de substrato
N _{bulk}	Número de moléculas que contribuem para o sinal Raman normal
NIR	Near InfraRed
Nm	nanômetros
Nº Avog	nº de Avogadro (6,022 x 10 ²³)
NPAg	Nanopartículas de Prata
NPAu	Nanopartículas de ouro
NPMs	Nanopartícula(s) metálica(s)
NPs	Nanopartícula(s)
NR ₃	grupo funcional das aminas
N _{Surf}	Número de moléculas que contribuem para o sinal SERS
P.A.	Pureza Analítica
PO ₄ ³⁻	grupo fosfato
Rock	modo de vibração do tipo rocking
SCis 1M	solução de cisteína com concentração de 1mol.L ⁻¹
SEM	Scanning Electron Microscopy
SERS	Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície
SLav	Substrato Lavado
SNPAg	solução coloidal de nanopartículas de prata
SNPAgCis	cisteína em solução coloidal de nanopartículas de prata
u.a.	unidade arbitrária
UV-vis	Ultravioleta – Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	comprimento de onda
t	tempo
β	posição beta da ligação na estrutura do polissacarídeo
u	modo de vibração de estiramento simétrico
τ	modo de vibração do tipo torção
w	modo de vibração do tipo wagging
δ	modo de vibração deformação simétrica
δ_{as}	modo de vibração deformação assimétrica
u_{as}	estiramento assimétrico
γ	modo de vibração dobramento

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1.	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL: INFRAVERMELHO X RAMAN	23
2.2.	EFEITO RAMAN	24
2.3.	ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA PELA SUPERFÍCIE (SERS) COMO TÉCNICA DE DETECÇÃO	26
2.4.	SERS E AS NANOPARTÍCULAS DE METAIS.....	30
2.5.	ABLAÇÃO A LASER: UMA TÉCNICA LIMPA NA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	33
2.6.	SUBSTRATOS SERS E OS BIOPOLÍMEROS.....	35
2.7.	MOLÉCULAS SONDA UTILIZADAS EM SERS	38
3.	OBJETIVOS	40
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO	40
4.	METODOLOGIAS	41
4.1.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1.1.	LIMPEZA DAS PLACAS DE VIDRO.....	41
4.1.2.	ATIVAÇÃO DAS PLACAS DE VIDRO.....	41
4.1.3.	PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BOTRIOSFERANA.....	41
4.1.4.	SOLUÇÃO COLOIDAL DE NANOPARTÍCULA DE PRATA.....	41
4.1.5.	DESPROTEINIZAÇÃO DA BOTRIOSFERANA	43
4.1.6.	PREPARAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	43
4.1.7.	DEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULA DE OURO E DO ANALITO CISTEÍNA SOBRE O FILME DE BOTRIOSFERANA.....	44
4.1.8.	PREPARO DO FILME DE NP _{Au} SOBRE O VIDRO COM CISTEÍNA 1% E 10%.....	45
4.1.9.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE CISTEÍNA 10% EM COLOIDE DE OURO.....	45

4.1.10. PREPARO DE AMOSTRAS DO ANALITO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COLOIDE DE PRATA	45
4.1.11. DEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE NPA _g E DO ANALITO SOBRE O FILME DE BOTRIOSFERANA	46
4.1.12. TESTE DE LIXIVIAÇÃO DO CRISTAL VIOLETA DO SUBSTRATO.....	46
4.2. CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MATERIAIS OBTIDOS	47
4.2.1. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS) DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	47
4.2.2. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA - VISÍVEL (UV-Vis) DO FILME DE BOTRIOSFERANA COBERTO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	47
4.2.3. ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (DLS) DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE NANOPARTÍCULAS.....	47
4.2.4. ESPECTROSCOPIA RAMAN DOS ANALITOS NO SUBSTRATO.....	48
4.2.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	48
4.2.6. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	48
4.2.7. DIFRAÇÃO DE RAIO-X (DRX).....	49
4.3. CÁLCULO DO FATOR DE INTENSIFICAÇÃO (EF)	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1. INTRODUÇÃO

Novos métodos de detecção têm se tornado importantes alvos de estudo acadêmico nos últimos anos. Dentre as metas de pesquisa nesta área, procura-se sanar as dificuldades e limitações atreladas à identificação de substâncias orgânicas de importância biológica e médica. Das limitações encontradas nos métodos atuais (cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, eletrocromatografia capilar, fotoluminescência), podemos destacar o alto custo dos equipamentos utilizados, o tempo elevado para obtenção de resultados, e o preparo de amostra, que pode ser extremamente laborioso e alterar a natureza do analito, o que dificulta a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis (GARRELL, 1989; ALVAREZ-PUEBLA & LIZ-MARZÁN, 2012; YUAN et al, 2017).

O desenvolvimento de biossensores constituídos de materiais nanoestruturados tem surgido a fim de aperfeiçoar os atuais métodos de detecção existentes (FANG & ZHANG, 2010; POTARA et al, 2015).

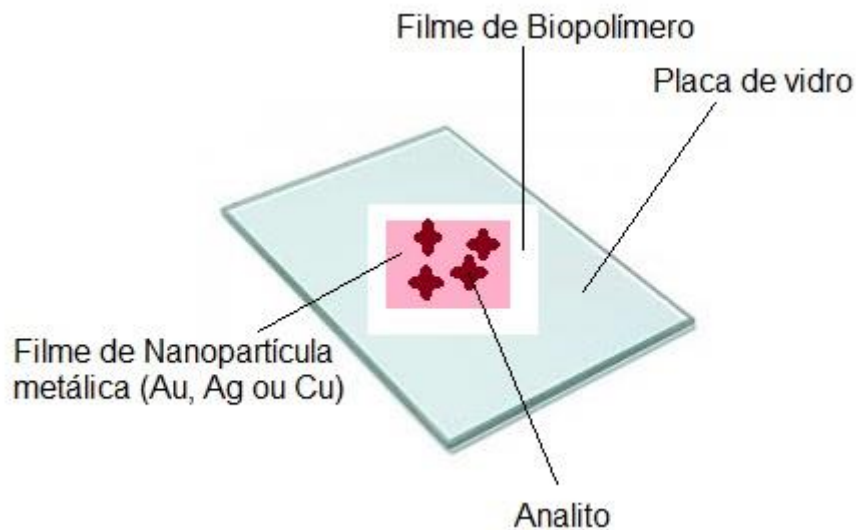
A nanotecnologia tem sido uma das grandes aliadas das áreas biomédicas e farmacêuticas no desenvolvimento desses biossensores para detecção de moléculas biológicas (biomarcadores) e farmacológicas, e pode possibilitar a quantificação de pequenas quantidades de analito de qualquer natureza, como no monitoramento da concentração de fármacos no plasma sanguíneo (BONIFACIO et al, 2014; YUAN et al, 2017; YADAV et al, 2017).

Atreladas a superfícies nanoestruturadas, algumas técnicas espectroscópicas têm sido alvo de diversas pesquisas na área da química analítica, no sentido de se estabelecer novos métodos de quantificação. Podemos destacar dentre as técnicas espectroscópicas vibracionais a Espectroscopia Raman, que baseada no espalhamento inelástico da luz nos fornece informações sobre estrutura, ligações e conectividade dos átomos no analito (GARRELL, 1989; COLTHUP et al, 1990; De FARIA & SANTOS, 1997; SALA, 2008).

Essa técnica permite a exploração do efeito SERS (do inglês, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, ou Espectroscopia Raman Intensificada pela Superfície), que promove a intensificação do sinal Raman de espécies químicas adsorvidas sobre uma superfície nanoestruturada (Figura 1). Ela tem sido um dos

grandes alvos de estudos visando produção de biosensores que possam detectar baixas concentrações de analito (SANT'ANA et al, 2006; KRASNOSLOBODTSEV et al, 2015; NGUYEN et al, 2017).

Figura 1 – Esquema representando a composição e estrutura do substrato SERS proposto neste trabalho, utilizando biopolímero coberto com nanopartículas metálicas, com o analito depositado na sua superfície.

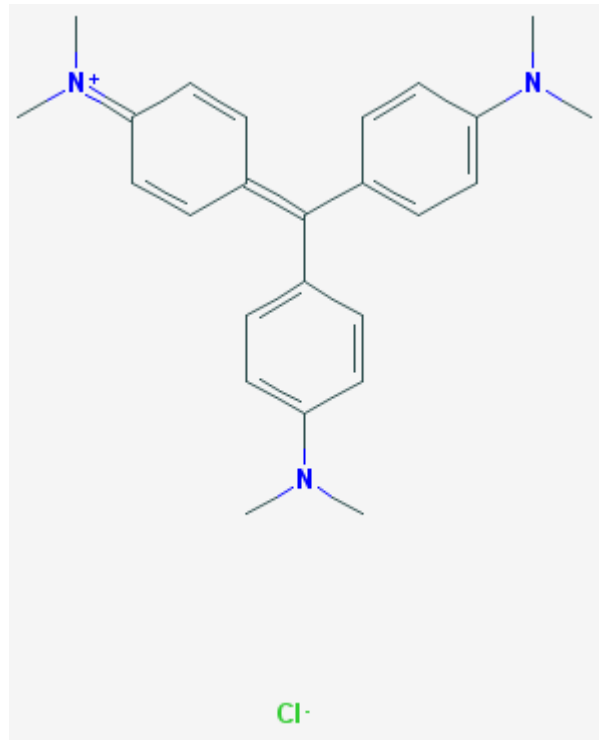


Fonte: autoral.

Um fator que influencia a obtenção de sinais SERS com alta intensificação é a escolha de moléculas sonda adequadas. É desejável que sejam adsorvidas sobre a superfície da nanopartícula de forma mais eficiente e colaborem com a estabilidade da superfície nanoestruturada, evitando a aglomeração das nanopartículas de metais ou mesmo funcionalizando esse material para uma aplicação específica (CHADHA et al, 2013).

O cristal violeta (CV), também conhecido como violeta de genciana (Figura 2) é uma das moléculas sonda mais utilizadas na avaliação do desempenho dos substratos SERS confeccionados com nanopartículas de metais. Além disso, é um fármaco antifúngico bastante eficiente no tratamento de algumas doenças e no combate e identificação de bactérias (LEE et al, 1988; LIU et al 2009; MENG, 2013; SANAPATI et al, 2014; ZHANG et al, 2015).

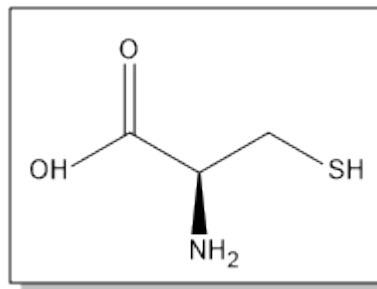
Figura 2 – Fórmula estrutural do cristal violeta.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

A molécula de cisteína (Figura 3) também tem potencial para aplicação como sonda SERS devido à presença de grupos funcionais sulfidrila (-SH) e amina (NR₃) que apresentam boa interação com nanopartículas de prata e ouro segundo o comportamento ácido/base de Pearson. Esse fator é bastante importante quando se trata da detecção de moléculas em superfícies SERS-ativas, pois contribui para melhor adsorção dessa molécula na superfície. A cisteína é um aminoácido presente na composição de diversas proteínas e caracteriza-se como um modelo de molécula biológica para testar a intensificação SERS do substrato.

Figura 3 – Fórmula estrutural da molécula de cisteína.



Fonte: autoral

Um dos grandes desafios para aplicação de SERS como técnica de detecção está na confecção de substratos simples e baratos, que resultem na obtenção de espectros reprodutíveis. Materiais provenientes de fontes naturais, como os biopolímeros, têm se destacado, por apresentar algumas propriedades desejáveis. Entre elas destacam-se as características estruturais para a formação de filmes finos, biocompatibilidade e grupos funcionais que promovem boas interações com as nanopartículas de metais depositadas (MAHOUCHE-CHERGUI et al, 2013; AHMED et al, 2016; YADAV, 2017). Essas características contribuem para sua aplicação como base de substratos SERS cobertos com nanopartículas metálicas, possibilitando maior eficiência na adsorção e detecção do analito. Desta forma, este trabalho propôs a preparação de substratos SERS compostos de filmes de um polissacarídeo, cobertos com uma fina camada de nanopartículas metálicas, bem como a sua avaliação na detecção das moléculas-sonda acima citadas por espectroscopia Raman.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL: INFRAVERMELHO X RAMAN

A espectroscopia vibracional é uma técnica que permite investigar algumas propriedades e características moleculares. Dados sobre a estrutura molecular, ligações químicas e níveis de energia podem ser obtidos. A interação da luz com a matéria é o que caracteriza as técnicas espectroscópicas. O momento em que a luz interage com a molécula, promovendo vibração, é onde se originam os espectros vibracionais no infravermelho e no espalhamento Raman (SALA, 2008).

As duas técnicas são bem semelhantes em termos de espectros vibracionais. Porém, enquanto a absorção da luz caracteriza a obtenção de espectros no infravermelho, o princípio do método que abrange a espectroscopia Raman é o espalhamento inelástico da luz que interage com a matéria. Tanto a absorção no infravermelho como o espalhamento Raman são resultados das diferenças de energia que ocorrem entre os dois estados vibracionais da molécula (SALA, 2008).

Porém, para apresentarem modos vibracionais ativos no Raman ou no infravermelho as moléculas devem dispor de algumas propriedades intrínsecas ou mesmo adquirí-las por um determinado momento. No caso do infravermelho, o momento de dipolo da molécula é determinante para que a molécula analisada apresente sinal. O Raman necessita de uma mudança na polarizabilidade da molécula, são resultantes do campo eletromagnético a que a mesma foi submetida. Nesse caso, a molécula deve variar sua polarizabilidade quando a luz é incidida sobre ela, originando o fenômeno físico conhecido como espalhamento inelástico da luz (COLTHUP, 1990).

São dois os estágios que caracterizam o contexto da descoberta do efeito Raman. O teórico, relatado pelo físico Adolf Gustav Stephan Smekal em 1923, com estudos de espalhamento de Raios-X pela matéria que levaram à descoberta do efeito Compton, sugerindo que o mesmo efeito poderia ser observado se houvesse a utilização da luz visível. E o segundo, que foi experimentalmente testado na Índia por Chandrasekhara Venkata Raman em 1928, a quem se deve o nome da técnica (COLTHUP, 1990; De FARIA & SANTOS, 1997).

Tanto o infravermelho como a Espectroscopia Raman são técnicas bastante versáteis, rápidas e não destrutivas. No entanto, a Espectroscopia de espalhamento Raman seria, em contrapartida, uma técnica pouco sensível em suas condições normais quando comparada ao infravermelho. Mas, quando algumas propriedades se tornam possíveis de serem exploradas, como na Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS), pode-se aumentar de forma considerável a sensibilidade da técnica, podendo-se detectar moléculas em concentrações de 10^{-18} g.L⁻¹ (De FARIA et al, 1999; LIU & WU, 2006; YUAN et al, 2017)

As análises realizadas por essa técnica não necessitam de um preparo de amostra de qualquer natureza, assim como exclui a necessidade de um tamanho determinado de amostra para ser analisado, facilitando ainda mais o seu uso e diminuindo os custos e o tempo para análise (COSTA, 2012).

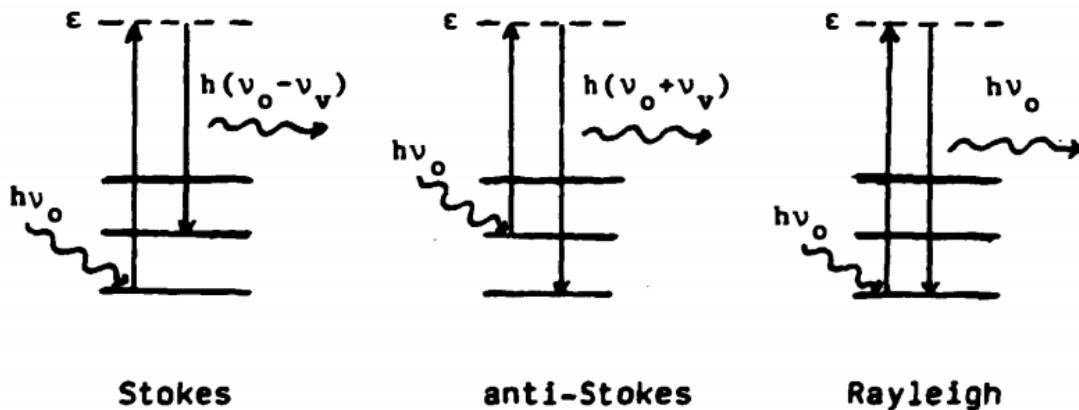
Outro fator extremamente importante que qualifica a Espectroscopia Raman frente à Espectroscopia no infravermelho, é a possibilidade de análises em meio aquoso sem qualquer interferência. Pois a molécula de água apresenta modos vibracionais pouco ativos no Raman e mesmo tendo se apresentado por longos anos com uma instrumentação mais onerosa, o desenvolvimento dos lasers e detectores diversos, empenhados no refinamento da técnica, tem colocado a Espectroscopia Raman no mesmo patamar que a Espectroscopia no Infravermelho em termos de custo, além de possibilitar a portabilidade e compactação do equipamento (SALA, 2008; COSTA, 2012).

2.2. EFEITO RAMAN

Na espectroscopia Raman, quando a radiação incidente (I_0) interage com a matéria, são observados três tipos de frequência que resultam em espalhamentos da luz (Figura 4). O espalhamento elástico da luz, conhecido como espalhamento Rayleigh, é caracterizado por apresentar frequência igual a frequência da radiação incidente, que não traz nenhuma informação da amostra analisada, e ainda, há os espalhamento Raman Stokes (mais comum) e o Raman anti-Stokes. O espalhamento Stokes corresponde ao espalhamento em uma frequência menor que a frequência da radiação incidente. E a anti-Stokes equivale ao espalhamento em uma frequência maior que a frequência da luz incidente. Esses espalhamentos, originados

na espectroscopia Raman, passam a ser fundamentais na obtenção de espectros e caracterização de moléculas e constituem o que conhecemos como efeito Raman. (CHAN, 2012).

Figura 4 – Tipos de espalhamentos decorrentes da relação luz incidente e espalhada na técnica de espectroscopia Raman.



Fonte: SALA, 1986.

- Onde h = constante de Plank, ν = radiação espalhada e ν_0 = radiação incidente.

No mecanismo em que ocorre o espalhamento Raman, quando a radiação monocromática incide na amostra, a matéria passa por um estado intermediário, mais comumente conhecido como virtual. Após a passagem da matéria por esse estado intermediário o mesmo decai para um estado excitado com frequência menor (Stokes) ou para o estado fundamental característico da molécula analisada, com frequência maior (anti-Stokes) (SALA, 2008).

Uma explicação quântica para o acontecimento desses fenômenos são as transições de fônons que ocorrem no momento de relaxação da molécula, quando ela sai do seu estado vibracional excitado e volta ao seu estado fundamental. Nesse momento os fônons que caracterizam os modos normais da molécula podem ser somados ou subtraídos aos fótons da radiação incidente que resultam em espalhamentos com frequências menores (Stokes) ou frequências maiores (anti-stokes) (Figura 4) (CHOU et al, 2005; FERNANDES, 2010; GAVELÁN, 2011).

As frequências atribuídas à radiação que permitem a observação do efeito Raman são altas, geralmente utilizam luz monocromática (laser) na região do visível, assim como podem fazer uso da radiação (laser) do infravermelho próximo

(NIR) (De FARIA et al, 2002). Apenas elétrons reagem a essas frequências por meio da polarizabilidade. A polarizabilidade da molécula, induzida pelo campo elétrico incidente, é um fator fundamental para que ocorra o espalhamento inelástico da luz que caracteriza o efeito Raman (COSTA, 2012).

Para se estabelecer a ocorrência desse efeito, a radiação incidente deve promover um deslocamento da nuvem eletrônica da molécula analisada. Quanto maior a molécula, mais elétrons ela terá, e maior será o tamanho da nuvem eletrônica ao seu redor. Com isso, espera-se que a polarizabilidade nessas moléculas seja maior quando submetidas a um campo eletromagnético, e assim, mais pronunciado será o sinal obtido na espectroscopia Raman para as mesmas (COSTA, 2012).

A espectroscopia Raman é constituída de alguns efeitos que, com o desenvolvimento da técnica em termos de instrumentação, contribuíram para melhorar a sua sensibilidade. Dentre esses efeitos podemos destacar além do Raman convencional, que acabamos de descrever, o efeito Raman Ressonante e a Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS) (COSTA, 2012).

Esses dois efeitos, associados ao espalhamento Raman convencional, proporcionaram um avanço tão grande na área de espectroscopia Raman, que a técnica tem se tornado uma referência na detecção de moléculas específicas com alta sensibilidade, principalmente com a utilização do efeito SERS, bastante explorado na química medicinal e farmacêutica. (De FARIA, et al 1999; CHEN et al, 2012; NGUYEN et al, 2017).

2.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE (SERS) COMO TÉCNICA DE DETECÇÃO

A espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS) se baseia na intensificação do sinal do Raman de uma molécula adsorvida numa superfície metálica nanoestruturada. Tornou-se uma solução para otimizar a detecção de substâncias que se apresentam em baixas concentrações, uma vez que o Raman convencional apresenta sinais fracos para esse tipo de investigação (GRASSESCHI & TOMA, 2017; YUAN et al, 2017).

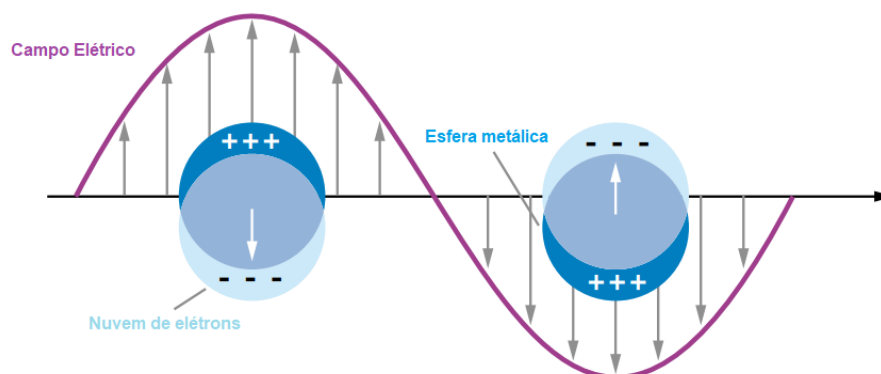
A SERS nos últimos anos tem se tornado uma técnica de análise química bastante importante por dois motivos: a riqueza de detalhes dos espectros

obtidos com informações de impressão digital na caracterização de moléculas específicas e a especificidade do *single-molecule detection*, onde é possível obter a intensificação do sinal de uma única molécula adsorvida na superfície nanoestruturada com espectros detalhados sobre as suas propriedades (LE RU et al, 2007; YUAN et al, 2017).

O efeito SERS na espectroscopia Raman é uma particularidade conhecida há 43 anos. Em 1974 foi observado o primeiro efeito SERS por Fleischman, quando o mesmo analisava a molécula de piridina adsorvida sobre eletrodo de prata rugoso. Observado um aumento do sinal Raman da molécula de piridina, a técnica de intensificação do sinal por superfície começou a crescer em diversas áreas, tornando-se uma potencial ferramenta de análises em eletroquímica, ciências biológicas e ciências de materiais (FLEISCHMAN et al, 1974; GRASSESCHI & TOMA, 2017; YUAN et al, 2017).

Dois mecanismos contribuem para o efeito SERS: o mecanismo eletromagnético e o mecanismo químico ou de transferência de carga. O primeiro corresponde à formação do campo eletromagnético na superfície metálica nanoestruturada quando exposta à radiação incidente, resultando na excitação do plasmon de ressonância das nanopartículas metálicas (WILLETS & DUYNE, 2007). O plasmon de ressonância evidencia a movimentação dos elétrons ao redor do núcleo da nanopartícula, promovendo o fenômeno de “mar de elétrons”, originando o que é conhecido como superfície plasmônica (Figura 5).

Figura 5 – Movimentação do plasmon de ressonância com a luz incidente.

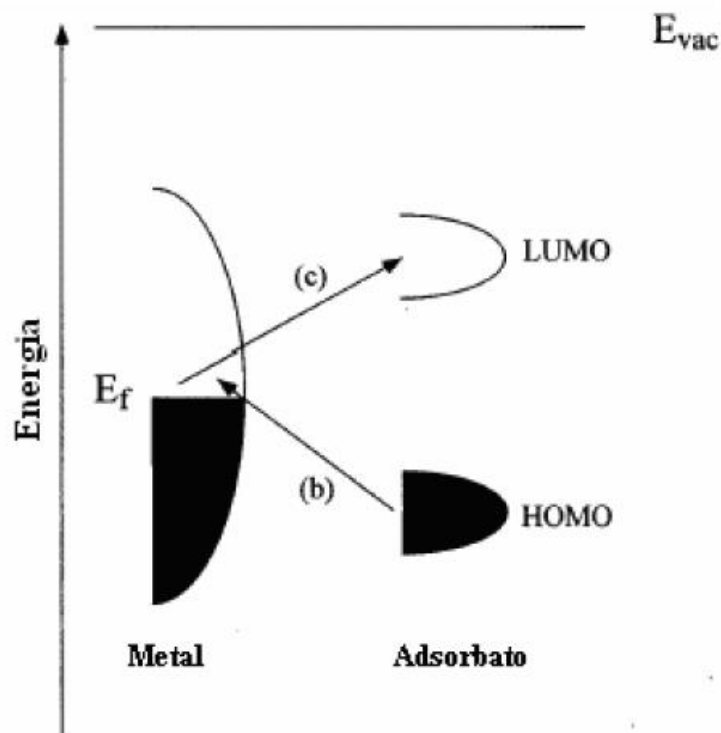


Fonte: Adaptado de WILLETS & DUYNE, 2007.

O plasmon excitado pela radiação incidente induz o aumento do campo elétrico ao redor do adsorvato, que libera essa energia em forma de espalhamento da luz, promovendo o efeito SERS. Trata-se do mecanismo que apresenta maior contribuição para observação desse fenômeno (McMAHON et al, 2013).

O mecanismo de transferência de carga (Figura 6) também contribui, mesmo que minimamente, para ocorrência do efeito SERS. Nele ocorre interação eletrônica ou transferência de cargas entre a molécula adsorvida e a superfície metálica, quando há proximidade entre os níveis dos orbitais de fronteira do analito e o nível Fermi do metal. Essa proximidade origina um aumento considerável nas vibrações moleculares do adsorvato assim como na ressonância, nos casos em que a energia da radiação incidente coincide com a energia da transferência. Essa movimentação gera um aumento do campo elétrico nessa região, que contribui em parte na explicação do efeito SERS (LE RU & ETCHEGOIN, 2008; HAO et al, 2015).

Figura 6 – Sistematização do mecanismo de transferência de carga mostrando a aproximação entre os orbitais de fronteira do adsorbato e os elétrons de Fermi da superfície das NPM.



Fonte: CAMPION & KAMBHAMPATI, 1998.

- Onde (b) e (c) correspondem na Figura 6 a direção da transferência de carga de um orbital molecular do adsorbato para um orbital atômico do metal e E_f corresponde a energia de Fermi, indicando que apenas os elétrons da superfície da NP participam desse mecanismo.

Os mecanismos que estão por trás do efeito SERS são cruciais para que possamos entender como o efeito SERS acontece e como esse efeito vai permitir a detecção de moléculas. Mas, certas propriedades nos materiais utilizados como substratos devem ser levadas em consideração para que o efeito ocorra.

Um exemplo é a rugosidade da superfície do substrato, considerada um parâmetro essencialmente importante. Superfícies ásperas e com ilhas de metais são promissoras para o realce do sinal no Raman, visto que o campo eletromagnético é mais pronunciado nessas regiões e o espalhamento da luz responde com maiores fatores de intensificação para as moléculas adsorvidas nessa superfície. A análise de piridina, por exemplo, que foi o primeiro composto que apresentou evidências de SERS sobre eletrodo de prata, conseguiu uma intensificação de sinal em cerca de 10^5 – 10^6 ordens de grandeza, atribuída ao melhoramento do campo existente na superfície rugosa do eletrodo (FLEISCHMANN et al, 1974; De FARIA et al, 1999; WANG et al, 2007).

Superfícies rugosas aumentam a sensibilidade da técnica devido à concentração do plasmon de ressonância nas imperfeições existentes, o que gera um campo elétrico maior para as moléculas adsorvidas no substrato. A rugosidade do substrato é tão importante para a observação da intensificação do sinal, que trabalhos empenhados em melhorar a superfície nanoestruturada em termos de aglomerados de metais conseguiram obter um aumento de sinal no Raman de cerca de 10^{14} ordens de grandeza (HE et al, 2014; GÓMEZ-GOMÉZ et al, 2016).

Um bom substrato SERS, para ser aplicado como um detector eficiente, além de apresentar ilhotas de metais (*Hot-spots*), deve ainda apresentar compatibilidade química e biológica com o analito, estabilidade química e preparação reprodutível e econômica (LUO et al, 2014; LIU et al, 2016).

Em virtude de conservar principalmente as características de fácil preparação e economia na síntese, os coloides de metais têm se apresentado como uma solução ideal para observação do efeito SERS. Várias formas e tamanhos de nanopartículas podem ser obtidas (LUO et al, 2014; DUGANDZIC et al, 2016).

A grande desvantagem presente na utilização de coloides de metais como material para detecção de moléculas em SERS é justamente o fato de não apresentarem reprodutibilidade nos respectivos métodos de obtenção. A deposição de finas camadas de nanopartículas em superfícies garantem uma maior estabilidade do material e pode proporcionar uma maior precisão nas análises realizadas (LUO et al, 2014; DUGANDZIC et al, 2016).

É importante lembrar que superfícies rugosas e sequências de aglomerados metálicos nanoestruturados são interessantes para promoção do efeito SERS e intensificação do sinal do Raman, pois a contribuição do mecanismo eletromagnético nessas áreas é bastante evidente. Substratos metálicos que apresentam essas características são promissores para a utilização em diversas áreas de detecção analítica e bioquímica (LI et al, 2017).

Outro fato importante sobre SERS, é que este efeito não se limita apenas à região do visível. Por ser uma técnica nova e pouco explorada, há pouco menos de 20 anos foi evidenciada na literatura a observação do efeito SERS com excitação na região do infravermelho próximo em 1064 nm, com um equipamento Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman). Esse equipamento, recentemente desenvolvido, permite facilmente a realização de análises de amostras biológicas, por eliminar a interferência ocasionada pela fluorescência. Este é um limitante nas análises envolvendo as técnicas espectroscópicas por Raman (SANT' ANA et al, 2006; CIALLA et al, 2012).

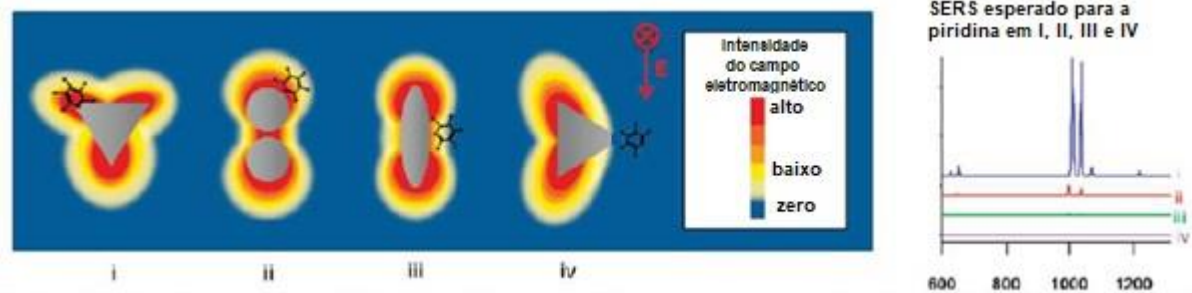
2.4. SERS E AS NANOPARTÍCULAS DE METAIS

As nanopartículas de metais têm grande importância na obtenção do efeito SERS, pois são elas que permitem a observação desse efeito no Raman, contribuindo na formação do Plasmon de ressonância que é resultado da excitação dos elétrons presentes em sua superfície, colaborando com o mecanismo eletromagnético por trás do efeito (SALA, 2008; LUO et al, 2014; LI et al, 2017).

A formação do plasmon de ressonância tem como consequência o aumento do campo elétrico na superfície da nanopartícula, que depende principalmente da sua forma e tamanho. Esses parâmetros influenciam substancialmente na intensificação do sinal do analito quando adsorvido na superfície

de um substrato nanoestruturado (Figura 7) (MAHER, 2012; LUO et al, 2014; BAI et al, 2017).

Figura 7 – Influência do campo elétrico das diferentes formas de nanopartículas na detecção SERS da molécula de piridina. (i) nanoprisma triangular; (ii) nanodímero de esferas; (iii) nanoelipsoide; (iv) parte inferior do nanoprisma triangular.



Fonte: adaptado de COSTA, 2012.

As formas que as nanopartículas incorporam no momento de sua confecção abrangem elipsoides, esferas, triângulos, bastonetes, quadrados, nanoestrelas, nanoflores, entre outras. Elas possuem em algumas regiões de sua superfície pontos onde o campo eletromagnético gerado pela radiação é mais forte, que contribuem para o aprimoramento do efeito SERS (representados pelas regiões em vermelho na Figura 7) (MAHER, 2012).

Os *hot-spots* são lugares específicos na superfície das nanopartículas que apresentam um campo eletromagnético amplificado e tornam-se essencialmente importantes em substratos ativos para SERS, o aumento do campo elétrico induzido na molécula adsorvida na superfície dos substratos nesses pontos garantem maior espalhamento da luz e intensificação do sinal no Raman (BAI et al, 2017).

Normalmente nanopartículas esféricas isoladas não apresentam um efeito SERS pronunciado. Nesses casos o Plasmon de ressonância está distribuído de forma homogênea em toda a superfície, sendo o sinal SERS, quando acontece, pouco intensificado (MAHER, 2012; YUAN et al, 2017). Entretanto, seus dímeros (Figura 7ii) tendem a apresentar campos maiores que intensificam o sinal do analito, mostrando a importância de aglomerados na formação dos *hot-spots* (HAO & SCHATZ, 2004).

As melhores formas isoladas para nanoestruturas apresentarem *hot-spots*, em que se pode de forma clara observar esse efeito são em elipsoides, bastonetes e formas triangulares. Isso porque os elétrons polarizados em virtude da radiação incidente, tendem a se aglomerar nas extremidades e pontas existentes nos formatos geométricos em que estão dispostos (SUN et al, 2003; MURPHY et al, 2010).

Dos metais utilizados em nanopartículas para a obtenção do efeito SERS o ouro e a prata são os mais comuns. A quantidade de elétrons livres na superfície desses metais permite uma oscilação homogênea dos mesmos no espaço, que promove com maior efetividade o efeito de plasmon de ressonância, resultando em um melhor sinal nas análises realizadas na espectroscopia Raman (CHEN et al, 2008; ZHOU et al, 2012; ZHANG et al, 2017).

As nanopartículas provenientes desses metais conseguem acompanhar o relevo da superfície formada, garantindo maior estabilidade estrutural para a propagação do espalhamento da luz (CHEN et al, 2008; ZHOU et al, 2012; ZHANG et al, 2017). Outro fator importante é a biocompatibilidade dessas nanopartículas. A maior aplicação de SERS nos últimos anos tem sido justamente em áreas medicinais, farmacêuticas e forense, para análises ultrasensíveis (ZHANG et al, 2017).

As nanopartículas de ouro (NPAu), no contexto de SERS atual, têm sido bastante estudadas. Uma das características vantajosas das NPAu para aplicação em SERS é a versatilidade sintética, que permite a modulação de nanopartículas em diferentes tamanhos, formas e propriedades de superfície, além de serem inertes, o que viabiliza a sua aplicação para fins biológicos (NGUYEN & LEE, 2017).

No entanto, mesmo com propensão a oxidação mais rápida que as NPAu, as nanopartículas de prata (NPAg) apresentam fatores de plasmon de ressonância muito mais evidentes. Isto torna os sinais em SERS obtidos em substratos com NPAg muito mais resolvidos e intensos, sendo preferida a aplicação dessas nanopartículas em substratos SERS, além de diminuir o custo do substrato (FAN et al, 2013; SENAPATI et al, 2014; HARRAZ et al, 2015; WEI et al, 2018).

2.5. ABLAÇÃO A LASER: UMA TÉCNICA LIMPA NA PRODUÇÃO DE CÓLOIDES DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Como já mencionado anteriormente, a grande dificuldade dos pesquisadores que estudam a detecção de moléculas por SERS são os métodos utilizados para obtenção de um substrato eficiente. Eles devem garantir de forma considerável o aprimoramento do sinal do analito em concentrações baixas (FAN et al, 2013). Devem apresentar, além disso, reprodutibilidade dos espectros SERS obtidos e baixo custo, para serem aplicados em áreas biomédicas na detecção de moléculas biológicas e no monitoramento de fármacos, drogas de abuso, corantes e outras substâncias de interesse (VINOD & GOPCHANDRANDRAN, 2015; BYRAM et al, 2017).

Diante disso, vários métodos são utilizados para síntese dessas NPs e obtenção de suas soluções coloidais para confecção de substratos SERS. Dentre as vias sintéticas estabelecidas estão a redução por citrato e a redução eletroquímica. Com a evolução da tecnologia, abriu-se espaço para a litografia, que proporciona a obtenção de substratos com formas e texturas variadas (VINOD & GOPCHANDRAN, 2014; OLEA-MEJÍA et al, 2015; BYRAM et al, 2017).

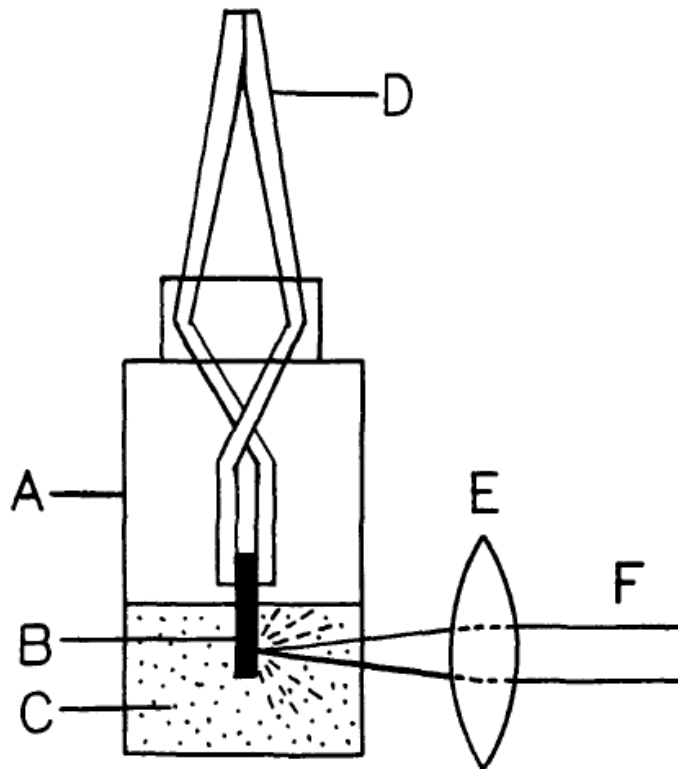
Porém, o grande inconveniente das rotas de síntese mencionadas engloba as múltiplas etapas envolvidas no processo até se obter a nanopartícula, o tempo gasto e os equipamentos utilizados demandam um custo alto na produção dos substratos para SERS, inviabilizando economicamente a sua aplicabilidade (NEDDERSEN et al, 1993; BYRAM et al, 2017).

Na tentativa de minimizar esses inconvenientes, a ablação a laser tem sido uma alternativa interessante. Tem contribuído com sínteses mais limpas, possibilita a utilização de água como solvente, não apresenta formação de subprodutos prejudiciais nas aplicações em SERS, que interferem na atribuição das bandas nos espectros, além de ser uma técnica simples, rápida e proporcionar a obtenção de nanopartículas metálicas estáveis (NEDDERSEN et al, 1993; VINOD & GOPCHANDRAN, 2014; OLEA-MEJÍA et al, 2015; BYRAM et al, 2017).

A técnica foi desenvolvida por Nedderson, Cotton e Chumanov, que mostram em seu artigo publicado em 1993 a instrumentação, vantagens e mecanismos que ocorrem no fenômeno de ablação a laser. A Figura 8 apresenta de

forma bem simplificada as partes do aparato e suas aplicações na obtenção das nanopartículas (NEDDERSEN et al, 1993).

Figura 8 – Instrumentação utilizada para o processo de ablação a laser. (A) Recipiente da amostra; (B) Lâmina metálica (Au, Cu, Ag, etc.); (C) Solvente (água ou orgânico); (D) garra suporte para a lâmina metálica (E) lentes; (F) Raio Laser.



Fonte: NEDDERSEN et al, 1993.

O mecanismo proposto na obtenção das nanopartículas de metais por técnica de ablação a laser consiste na incidência de um raio laser em uma lâmina metálica (para os casos onde se deseja a obtenção de nanopartículas de metais) imersa em um solvente. A alta energia do laser promove a formação de um plasma que entra em contato com o solvente e dá origem às nanopartículas metálicas por fenômenos de nucleação e crescimento, dispersando-se no solvente. Obtêm-se dessa forma, as soluções coloidais do material escolhido (NEDDERSEN et al, 1993; VINOD & GOPCHANDRAN, 2014; VINOD & GOPCHANDRAN, 2015).

É importante deixar claro que a ablação a laser não está limitada apenas à produção de nanopartículas de metais, outros sólidos podem se beneficiar dessa técnica para produzir nanopartículas, como cerâmicos e óxidos. Uma das maiores aplicações dessa técnica está na confecção de nanoestruturas do tipo núcleo-camada. Esta se beneficia do controle que a técnica proporciona para a confecção das estruturas em termos de tamanho, forma e espessuras, unindo e otimizando as propriedades de dois ou mais materiais (VINOD & GOPCHANDRAN, 2015; OLEA - MEJÍA et al, 2015; BAO et al, 2017).

Um exemplo são as nanoestruturas de Au-SnO₂, que apresentaram alta intensificação do sinal SERS na detecção de moléculas de H₂S e fósforo orgânico em temperatura ambiente. Nanopartículas mistas (NPAu-NPAg) também foram confeccionadas com a utilização dessa técnica para detecção de cristal violeta e foi obtido uma intensificação do sinal em uma magnitude de 10⁵ (VINOD & GOPCHANDRAN, 2015; VINOD & GOPCHANDRAN, 2015; BAO et al, 2017).

A rodamina 6G também foi utilizada como molécula sonda na verificação de substratos de NPAu preparadas por ablação a laser, obtendo-se uma intensificação do sinal SERS de 10⁶ ordens de grandeza (BYRAM et al, 2017).

Como pode-se notar, a técnica de ablação a laser apresenta as vantagens de síntese, modeláveis e verdes. Além da alta pureza e estabilidade das soluções coloidais é possível se obter espectros mais limpos, visto que o material obtido está livre de contaminantes, dispersantes ou surfactantes, o que viabiliza o uso dessa via de síntese na preparação de substratos SERS com grande potencial nas aplicações biomédicas, como dispositivos biossensores (VINOD & GOPCHANDRAN, 2015; BYRAM et al, 2017).

2.6. SUBSTRATOS SERS E OS BIOPOLÍMEROS

A escolha de um substrato SERS ideal é o grande desafio nas pesquisas voltadas a esse fenômeno. O desenvolvimento desses substratos deve pontuar algumas características essenciais para que ocorra o espalhamento Raman intensificado por superfície, como o tamanho das nanopartículas, a sua forma e a agregação na superfície (ZHU et al., 2018).

As soluções coloidais e os materiais tratados eletroquimicamente são os substratos SERS mais utilizados pois apresentam uma intensificação do sinal que varia de 10^6 - 10^7 ordens de grandeza, porém são limitados pela falta de reprodutibilidade dos espectros. Isto se torna um limitante na utilização desses materiais em escala industrial, principalmente para aplicações médicas e farmacêuticas (HERING et al, 2008).

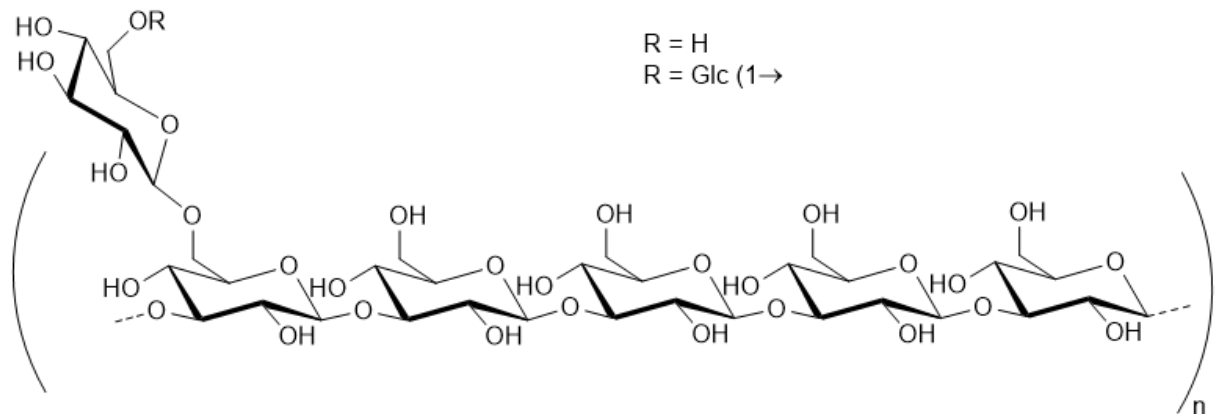
Como já mencionado, as pesquisas têm buscado estudar as propriedades de alguns materiais naturais para aplicação em SERS. A quitosana, um polissacarídeo que apresenta em sua estrutura uma diversidade de grupos amino e hidroxila, tem se destacado como suporte na preparação de substratos SERS cobertos com nanopartículas metálicas. Algumas características físico-químicas atribuídas a esse biopolímero são interessantes, como a alta regularidade da sua estrutura, porosidade e rugosidade. Esse biopolímero é facilmente encontrado no exoesqueleto das carapaças de crustáceos (WEI et al, 2010; ZHU et al, 2013).

Alguns trabalhos utilizando quitosana como filme fino para produção de biossensores estão presentes na literatura, utilizando nanopartículas de prata e ouro (WEI et al, 2010; LEIVA et al, 2015; XIANG et al, 2015). No entanto, ela apresenta baixa solubilidade em água, o que limita a utilização desse biopolímero, visto que além de buscar uma diversidade de materiais com potencial para um substrato ideal, deve-se principalmente prezar por suas propriedades verdes e por métodos de síntese menos dispendiosos.

Os polissacarídeos do tipo β -glucana são biopolímeros que apresentam algumas propriedades desejáveis para aplicação como suporte para estabilização das nanopartículas metálicas na preparação de substratos para SERS. Entre elas, podemos destacar a biocompatibilidade para a detecção de moléculas biológicas, biodegradabilidade, solubilidade em água e baixo custo. Um exemplo desse material é a botriosferana, produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*. Esse material tem grande potencial para atividade anti-inflamatória, antitumoral e imunomoduladora. Em virtude da sua rede polimérica entrelaçada pode ser aplicado na confecção de biomateriais (FRANÇA, 2007; SILVA et al, 2008; ZHU et al, 2016).

Essa β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-glucana dispõe em sua fórmula estrutural (Figura 9) vários grupamentos hidroxila apropriados para interação com as nanopartículas de metais depositadas sobre sua superfície (SILVA et al, 2008; MALINI et al, 2015).

Figura 9 – Fórmula estrutural da Botriosferana.



Fonte: autoral.

A rede polimérica é uma característica estrutural dos biopolímeros que permite a montagem de filmes de botriosferana, utilizando as técnicas de evaporação por solvente (*casting*). Essa característica permite que o polímero seja imerso em água sem sofrer completa dissolução, comportando-se como um hidrogel físico (sem a presença de reticulante). Percebe-se assim o seu potencial para formação de soluções que apresentam uma certa viscosidade ideal para formar filmes, além da contribuição da sua estrutura linear que torna seus filmes resistentes, flexíveis e transparentes (THARANATHAN et al, 2003; YANG et al, 2010; BUWALDA et al, 2014).

Com a secagem controlada, a água é retirada e as nanopartículas metálicas conseguem se acomodar no filme, ficando retidas na película de botriosferana, o que evidencia o grande potencial de polissacarídeos no desenvolvimento de substratos SERS e adsorção do analito para caracterização e detecção.

2.7. MOLÉCULAS SONDA UTILIZADAS EM SERS

Para realizar medições satisfatórias em SERS um fator que é crucial, senão o mais importante depois do efeito plasmon do metal, está no tipo de analito utilizado para testar o aprimoramento SERS do substrato (composto pelo biopolímero coberto com nanopartículas de metal). Esses são conhecidos como moléculas sonda e apresentam algumas características ótimas que promovem interações ideais com a superfície do substrato e acabam favorecendo o efeito SERS (LE RU & ETCHEGOIN, 2009; JEMIESON et al, 2017).

Dois fatores devem ser observados na escolha de uma molécula sonda SERS. O primeiro deles é a capacidade da molécula do analito em responder ao Raman normal, ou seja, quanto essa molécula é capaz de espalhar a luz incidente e o quanto o sinal dessa molécula pode ser intensificado por esse espalhamento (LE RU & ETCHEGOIN, 2009).

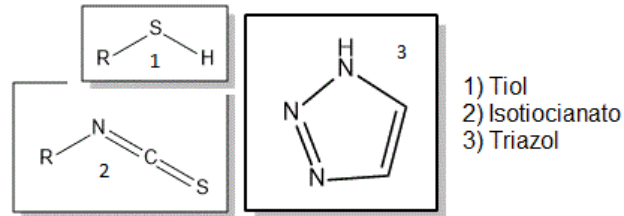
Deve-se considerar que uma molécula que é capaz de apresentar um sinal em cerca de 10^6 vezes no Raman normal com relação a sua linha de base, terá uma intensificação SERS de 10^6 vezes maior na superfície de um substrato nanoestruturado. Um exemplo típico de moléculas comumente utilizadas como sonda são os corantes, que apresentam um fator característico como espalhamento Raman ressonante (RRS), que contribui para que apresentem um sinal mais intenso que o Raman normal, sendo possível sua identificação em determinadas concentrações, mesmo sem a presença de NPM, por isso são preferencialmente utilizados como sondas (LE RU & ETCHEGOIN, 2009; GRACIE et al, 2016; ZHU et al, 2018).

A interação sonda/metálico é o segundo fator a ser considerado e se caracteriza como o mais importante deles. Nem toda molécula pode promover o efeito SERS se não apresentar uma interação eficiente com a superfície do substrato, mesmo que apresente um sinal considerável no Raman (GRACIE et al, 2016).

Considerando-se que as nanopartículas de ouro e prata são as mais utilizadas para confeccionar substratos SERS, é interessante utilizar como sondas moléculas que apresentem grupos capazes de se ligar ou associar fortemente às nanopartículas. Entre os grupos que apresentam fortes interações estão tiol, isotiocianato e triazol, apresentados na Figura 10. Esses grupos exibem afinidade com

as nanopartículas de ouro e prata e a forma com a qual adsorvem garante uma boa intensificação de SERS para avaliação do substrato (FAN et al, 2013).

Figura 10 – Grupos utilizados como moléculas sonda ativas em SERS.



Fonte: autoral

Interações eletrostáticas também são consideradas na utilização de um composto SERS - ativo. Corantes como o cristal violeta apresentam carga e podem ser adsorvidos quando o substrato apresenta carga oposta à sonda utilizada (LIANG et al, 1995; ZHANG et al, 2015; JEMIESON et al, 2017).

O preparo da superfície do substrato também pode ser considerado. Para análises biológicas, por exemplo, a funcionalização da superfície é bastante utilizada. Porém, outras etapas são necessárias, o que aumenta o custo da preparação do material (GRAHAM et al, 1997; HARPER et al, 2013; WANG et al, 2013).

Escolher uma molécula sonda nem sempre é algo fácil, porém deve-se adaptar de forma satisfatória ao objetivo do experimento. No caso dos corantes, por exemplo, uma das suas aplicações mais comuns como moléculas sonda é como marcadores de analitos alvo, devido à sua intensidade SERS. Nos estudos biológicos, esse tipo de aplicação para os corantes é muito comum, podendo levar à identificação de proteínas, anticorpos, DNA e fármacos (JEMIESON et al, 2017).

Logo, uma molécula que é ativa no Raman pode utilizar uma superfície metálica e suas propriedades Raman ressonantes para a obtenção do efeito SERS.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Preparar filmes finos de biopolímeros cobertos com nanopartículas metálicas, visando a obtenção de substratos para aplicação na Espectroscopia Raman Intensificada pela Superfície (SERS).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Depositar filmes do polissacarídeo botriosferana em placas de vidro;
- Depositar nanopartículas metálicas de Au e Ag sintetizadas por ablação a laser sobre o filme do polissacarídeo botriosferana;
- Caracterizar os materiais devidamente preparados por UV-vis, DLS, Espectroscopia Raman, Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Força Atômica, Difração de Raios – X;
- Avaliar a aplicação do filme de botriosferana coberto com NPAu e NPAg como substratos em SERS e seu potencial na identificação de moléculas de cisteína e cristal violeta.

4. METODOLOGIAS

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. LIMPEZA DAS PLACAS DE VIDRO

As placas de vidro utilizadas como base para a deposição do substrato SERS foram previamente lavadas com detergente e água corrente e em seguida foram secas em estufa. Solução piranha, em banho de gelo, foi utilizada para desengordurar as placas e mantê-las completamente limpas. Para o preparo dessa solução em banho de gelo, foram adicionados 40 mL de ácido sulfúrico P.A. e 13,3 mL de peróxido de hidrogênio P.A. Após a estabilização da solução piranha as placas de vidro já lavadas com detergente e secas, foram mergulhadas na mesma, ficando em repouso por 1h, e em seguida foram lavadas com água destilada e secas em estufa.

Obs.: A solução piranha é uma solução extremamente oxidante e deve impreterivelmente ser preparada em banho de gelo.

4.1.2. ATIVAÇÃO DAS PLACAS DE VIDRO

Após a limpeza das placas de vidro, deu-se início à etapa de ativação dos grupos silanol presentes na superfície da placa, para que a deposição do substrato orgânico obtivesse maior adesão possível à superfície. Uma solução básica foi preparada com 50 mL de água destilada, 10 mL de hidróxido de amônio e 10 mL de peróxido de hidrogênio, que foi adicionado lentamente. A solução foi então aquecida à 75 °C. As placas de vidro limpas e secas foram imersas nessa solução, ficando em repouso por 30 minutos, sendo em seguida lavadas com água ultrapura e secas em estufa.

4.1.3. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BOTRIOSFERANA

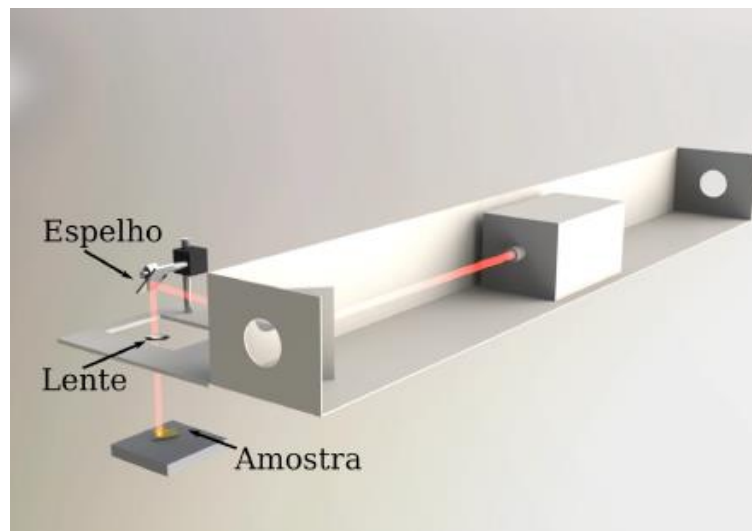
A botriosferana utilizada nesse trabalho foi gentilmente cedida e preparada pela professora Dra. Aneli de Melo Barbosa no laboratório de Bioquímica e

Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, de acordo com as metodologias pré-estabelecidas e otimizadas pela mesma e seus colaboradores (BARBOSA et al, 2003). A solução da botriosferana, utilizada como base do filme biopolimérico confeccionado nesse trabalho, foi preparada com a adição de 10 mg de botriosferana em 10 mL de água destilada, essa solução foi mantida sob agitação por 24h até total solubilização. Para conservação, toda a solução foi transferida para microtubos devidamente esterilizados. A botriosferana assim preparada é referida neste trabalho como *in natura*.

4.1.4. SOLUÇÃO COLOIDAL DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

As soluções coloidais de nanopartículas metálicas (SNP) foram sintetizadas por via física, pelo método de ablação a laser e o sistema utilizado para obter as suspensões de NP é mostrado na Figura 11, composto pelo laser para expelir as nanopartículas da superfície metálica para o solvente, espelho para direcionar o laser para a amostra, lente para mudar a polarização do feixe e amostra (placa metálica).

Figura 11 – Sistema utilizado para o processo de ablação a laser na confecção das nanopartículas metálicas.



Fonte: De OLIVEIRA, 2013.

As suspensões coloidais de NPAg e NPAu utilizadas e testadas nesse trabalho foram gentilmente cedidas pelo laboratório de física da UTFPR em Curitiba, coordenado pelo Prof. Dr. Arandi G. Bezerra Junior em colaboração com o Prof. Dr. Wido Schreiner da UFPR, que juntos são colaboradores nesse trabalho. Para obter as nanopartículas foi utilizado um laser Nd:YAG (Quantronix, modelo 117) cujo comprimento de onda foi igual a 1064 nm, com pulsos de 200 ns e energia pulsada de 3 mJ. A lente tinha de distância focal $d = 50$ mm e o diâmetro do feixe tinha 30 μm . Placas de prata ou de ouro foram utilizadas como alvos, de onde foram expelidas, com a ajuda da radiação, as nanopartículas que compuseram os coloides utilizados nesse trabalho, utilizando água como solvente.

4.1.5. DESPROTEINIZAÇÃO DA BOTRIOSFERANA

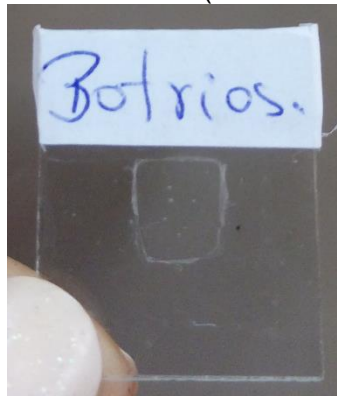
A desproteinação utilizou o fundamento de extração líquido-líquido, onde ocorre a partição da substância de interesse em duas fases líquidas por diferença de polaridade. Nessa extração foi adicionado em funil de decantação 60 mL de solução aquosa de botriosferana, 144 mL de clorofórmio e 36 mL de butanol. A mistura do funil foi lentamente agitada por 5 minutos, e deixada em repouso para ocorrer a separação de fases da mistura no funil por 15 minutos. A extração foi realizada por 3 vezes para 60 mL da solução de botriosferana. A solução aquosa obtida da extração foi transferida para uma proveta, onde foram adicionados a esta solução 180 mL de etanol para precipitar a botriosferana desproteínizada. Em seguida o material precipitado foi separado do sobrenadante por decantação e submetido à diálise em água destilada, evaporação sob vácuo e liofilização.

4.1.6 PREPARAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS

A técnica de deposição por evaporação do solvente (*casting*) foi utilizada nesse trabalho para depositar a solução polimérica de botriosferana nas placas de vidro tratadas e ativadas. Antes da deposição uma área de 0,25 cm² foi delimitada para que a deposição da solução do polímero se concentrasse nessa região, não correndo o risco de escoar, prejudicando a homogeneidade do filme na placa de vidro. Essa delimitação foi feita utilizando fita de resina PTFE. A solução

biopolimérica *in natura* (a desproteínização foi utilizada apenas para caracterização do filme de polissacarídeo formado na placa de vidro, a proteína residual não interfere nas análises SERS realizadas nesse trabalho pois a cobertura com NP elimina o efeito da fluorescência) foi aplicada na área com a ajuda de um conta-gotas, e duas camadas de filme foram adicionadas e secas à temperatura de 75 °C, sucessivamente, resultando no material apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Filme de botriosferana (ao centro) em suporte de vidro.



Fonte: autoral

4.1.7. DEPOSIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO E DO ANALITO CISTEÍNA SOBRE O FILME DE BOTRIOSFERNA

Nesta etapa, 0,5 mL de coloide de nanopartículas de ouro foi depositado pelo método de *casting* sobre o filme de botriosferana formado de forma aleatória na superfície do vidro (o filme de botriosferana utilizado não passou por desproteínização). Os materiais confeccionados nessa etapa inicial do experimento não foram delimitados quanto à área que o filme ocuparia.

Em seguida as soluções depositadas sobre o filme foram secas em estufa à 75°C, cerca de 6 camadas de nanopartículas foram adicionadas uma sobre a outra até se observar uma cobertura fina do filme de botriosferana. Sobre este substrato, 250 µL de solução de cisteína (10%) foram depositados, pelo mesmo método de deposição das nanopartículas, e levados a secagem em estufa a 75°C até se observar a evaporação completa da água e a estabilização do material sobre o filme formado.

4.1.8. PREPARO DO FILME DE NPAu SOBRE O VIDRO COM CISTEÍNA 1% E 10%

Nessa etapa dois filmes de NPAu foram preparados com 0,5 mL de solução coloidal de NPAu depositada sobre o vidro e em seguida 250 μ L de solução de cisteína (1 % e 10%) foi adicionado em cada superfície do filme formado. O material foi submetido a secagem em estufa à 75 °C até completa evaporação do solvente.

4.1.9. PREPARO DA SOLUÇÃO DE CISTEÍNA 10% EM COLOIDE DE OURO

Nessa etapa foi preparada uma solução de 650 μ L contendo o coloide de NPAu e 100 μ L de solução de cisteína 10% que foi posteriormente submetida as análises por espectroscopia Raman na radiação de 785 nm.

4.1.10. DEPOSIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DO ANALITO SOBRE O FILME DE BOTRIOSFERANA

Nesta etapa, soluções de 100 μ L de cisteína e 650 μ L do cristal violeta foram preparadas com diferentes concentrações em colóide de prata. A técnica de deposição por evaporação do solvente (*casting*) foi utilizada para aplicar estas misturas na superfície do filme de botriosferana.

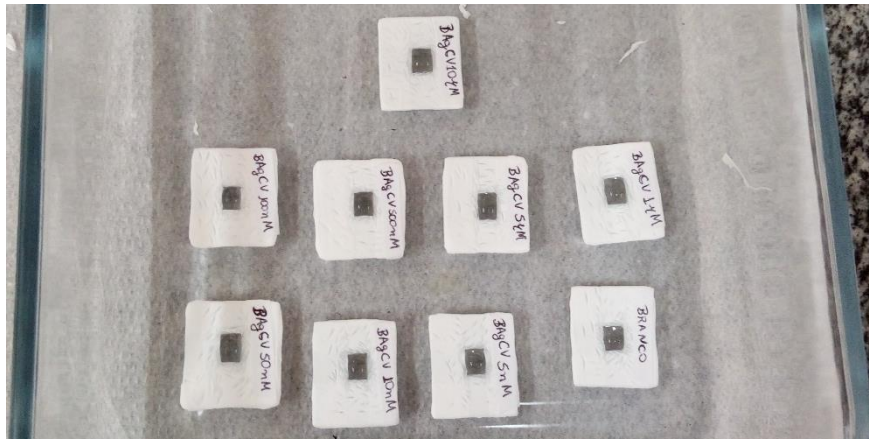
Foram realizadas cerca de sete aplicações para cada lâmina, camada por camada, até que toda a mistura de coloide contendo o analito estivesse retida no filme do biopolímero.

Para as análises com cisteína foram preparadas soluções em coloide de prata nas concentrações de 1,0 mol.L⁻¹; 125,0; 15,0; e 1,0 mmol.L⁻¹, que em seguida foram depositadas sobre o biopolímero diretamente.

Para as análises realizadas com o cristal violeta, foram preparadas soluções em colóide de prata nas concentrações de 1,0 mmol.L⁻¹, 500,0; 100,0; 50,0; 10,0; 5,0; 1,0 μ mol.L⁻¹, 500,0; 100,0; 50,0; 10,0 nmol.L⁻¹ e aplicadas diretamente sobre o filme de botriosferana.

Todas as amostras depositadas sobre o filme foram secas sucessivamente após cada aplicação, a 65 °C. As amostras com cristal violeta estão apresentadas na Figura 13.

Figura 13 – Filmes de Botriosferana cobertos com NPAg e cristal violeta (retângulos escuros ao centro das placas).



Fonte: autoral

4.1.11. PREPARO DE AMOSTRAS DO ANALITO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM COLÓIDE DE PRATA PARA ANÁLISE NO RAMAN

Para efeito de comparação das análises realizadas nos substratos, análises da molécula de cisteína e do cristal violeta foram realizadas em solução coloidal de NPAg. Para isso, foram preparadas soluções desses analitos em coloide de prata em diferentes concentrações, em um volume de 650 μL .

Para a cisteína foram realizadas análises em coloide de NPAg nas concentrações: 1,0 mol.L^{-1} ; 125,0; 15,0 e 1,0 mmol.L^{-1} .

Para as análises feitas para o cristal violeta, foram preparadas soluções nas concentrações: 1,0 mmol.L^{-1} , 500,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 100,0, 50,0, 10,0, 5,0, 1,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 500,0 nmol.L^{-1} , 100,0, 50,0, 10,0 nmol.L^{-1} . As amostras contendo cristal violeta foram analisadas também em coloide de NPAg.

4.1.12. TESTE DE LIXIVIAÇÃO DO ANALITO A PARTIR DO SUBSTRATO

Nesse teste, o substrato, contendo o analito cristal violeta, foi lavado em 3 etapas e analisado por Espectroscopia Raman (item 4.2.3) ao final de cada uma delas. Essas etapas consistiram em 20 ciclos de lavagem cada uma, utilizando água

destilada como solvente lixiviador. Cada ciclo teve um intervalo de 10 s, até completar os 20 ciclos determinados para cada etapa.

4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS OBTIDOS

4.2.1. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis) DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Os espectros UV-Vis foram realizados na UTFPR/Curitiba-PR, obtidos em equipamento da marca Ocean Optics composto por um detector USB2000+XR e uma fonte de luz modelo USB ISS UV/Vis. Esse equipamento abrange os comprimentos de onda de 200 nm – 1025 nm e as análises das amostras de coloide foram realizadas mediante 65 varreduras nessa região, com um tempo de aquisição dos espectros inferior a 1,7 ms e resolução de 2 nm.

4.2.2. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis) DO FILME DE BOTRIOSFERANA COBERTO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Os espectros UV-Vis foram realizados no Laboratório de Espectroscopia da UEL (ESPEC - UEL) em Espectrofotômetro Ultravioleta-Visível Shimadzu, modelo UV-2600, com tela de cristal líquido, controlado por PC e interface USB. Esse equipamento abrange os comprimentos de onda de 190 – 1100 nm e as análises das amostras foram realizadas mediante uma varredura na região de 200 – 900 nm com tempo de aquisição dos espectros de 20 s e 32 varreduras.

4.2.3. ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (DLS) DA SOLUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

O modelo do equipamento DLS, utilizado para obter informações sobre o tamanho das partículas sintetizadas, foi o Microtrac Nanotrak Ultra. O equipamento apresenta um laser contínuo de diodo e um comprimento de onda de 780 nm com uma potência de 3mW. As análises de DLS foram realizadas na UTFPR/Curitiba-PR. Nessa análise o laser incide na amostra através de uma fibra

óptica que apresenta uma janela de safira no final, a qual reflete a radiação para o detector e nos dá informações sobre tamanho e dispersão das nanopartículas no coloide, de acordo com a sua velocidade na solução (DE OLIVEIRA, 2013).

4.2.4. ESPECTROSCOPIA RAMAN DOS ANALITOS NO SUBSTRATO

As análises dos analitos nos substratos, do filme de botriosferana e das soluções coloidais com os analitos por espectroscopia Raman foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina (ESPEC-UEL), e contou com um espectrômetro Jobin Yvon NT64000 cuja radiação excitante foi de 532 nm. Utilizou-se um microscópio Olympus para focalizar a radiação incidente sobre as amostras e um Microscópio Confocal Raman WITEC alfa 300+ com sensibilidade para 532 e 785 nm de comprimentos de onda de excitação e configuração de alta vazão. Os experimentos foram realizados mediante 10 varreduras nos tempos de aquisição de 1s e 3s.

4.2.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura das lâminas contendo os substratos foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise da UEL (LMEM - UEL) e contou com um Microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200. As amostras passaram por uma metalização de ouro antes de efetuar-se a análise e alcançaram uma resolução de 3000, 5000 e 10000 magnitudes.

4.2.6. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

As imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia da UEL (ESPEC). O modelo do equipamento utilizado é denominado Nanosurf easyScan II FlexAFM, as análises procederam no modo de não contato, com uma resolução de 256 pontos por linha (1,5 s/linha) e o tempo de análise para cada região foi de 15 min.

4.2.7. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

As medidas de difração de raios X (DRX) foram realizadas no Laboratório de Análises por Raios-X (LARX) da Central de Mídias da UEL em um difratômetro da marca PANanalytical modelo X'Pert PRO MPD utilizando a geometria Bragg-Brentano, com radiação Cu k_{α} (1,5450 Å) monocromatizada com cristal de grafite, faixa angular (2θ) de 3 a 130°, passo angular de 0,05° e passo de tempo de 5 segundos. A tensão e a corrente de operação do tubo de raios X foram respectivamente de 40 kV e 30 mA.

Os cálculos de distância entre os planos atômicos e o ângulo de distância considerado pelo equipamento foram calculados a partir da equação da Lei de Bragg (1) (CULLITY, 2001).

$$n\lambda = 2.d. \text{sen}(\theta) \quad (1)$$

Onde, n = número cristalino inteiro, λ = comprimento de onda da radiação incidente, d = distância entre os planos atômicos, θ = ângulo de incidência da radiação em relação ao plano.

4.3. CÁLCULO DO FATOR DE INTENSIFICAÇÃO (EF)

Os fatores de intensificação foram calculados segundo HARRAZ et al, 2015 (2), que levou em consideração a medida da área da intensidade SERS e Raman normal (I_{SERS} e I_{bulk}) da banda em 1622 cm^{-1} nos espectros do cristal violeta e da banda em 521 cm^{-1} para os espectros Raman da cisteína.

$$EF = \frac{I_{SERS}}{I_{Bulk}} \times \frac{N_{Bulk}}{N_{surf}} \quad (2)$$

Os parâmetros para o cálculo do fator de intensificação (EF) correspondem à: I_{SERS} como sendo a área da intensidade da banda do espectro SERS da molécula analisada, N_{surf} se trata da quantidade de moléculas que contribuem para

a obtenção do sinal no substrato SERS, I_{bulk} é a área da intensidade da banda no Raman normal e N_{bulk} corresponde à quantidade de moléculas que contribuem para a intensidade dessa banda.

Os valores das áreas de intensidade das bandas em 1622 cm^{-1} e 521 cm^{-1} foram calculados com o auxílio do programa OriginPro 8.5 a partir da deconvolução dessas bandas nos espectros. O número de moléculas (N_{SERS} e N_{bulk}) foi calculado de acordo com a metodologia proposta por LIU et al, 2009 e incluiu no seu cálculo a concentração do analito, a quantidade de massa por área de substrato, a ordem de grandeza da potência do laser (10^3 w) e o diâmetro do laser que interage com a amostra que corresponde a $50 \text{ }\mu\text{m}$.

Para as amostras em solução foi considerado o diâmetro do vial para portar as amostras correspondente a 40 mm e a sua profundidade igual a 8 mm . Os cálculos adaptados para encontrar os valores de N_{bulk} e N_{SERS} (3) e (4) foram baseados em LIU et al, 2009.

$$N_{\text{bulk}} = C \times V \times I \times n^{\circ} \text{ Avog} \quad (3)$$

Onde o C = concentração da amostra, V = volume que interage com laser, I = potência do laser na amostra, $n^{\circ} \text{ Avog.} = 6,022 \times 10^{23}$.

$$N_{\text{SERS}} = \frac{n}{\text{cm}^2} \times A_{\text{laser}} \times I \times n^{\circ} \text{ Avog} \quad (4)$$

Onde, n/cm^2 = número de mol/área de substrato; A_{laser} = área da amostra que interage com laser; I = potência do laser na amostra; $n^{\circ} \text{ Avog.} = 6,022 \times 10^{23}$.

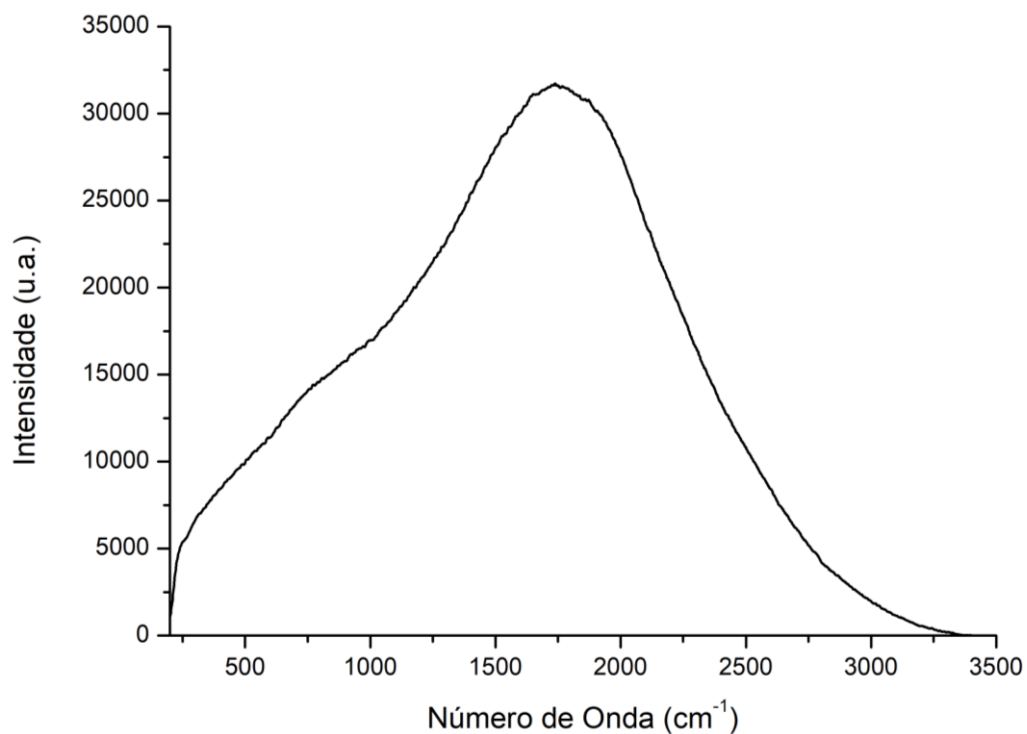
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A botriosferana, um tipo de β -glucana, foi empregada neste trabalho como suporte para deposição das nanopartículas metálicas (NPM) na confecção de substratos SERS, a fim de evitar a desestruturação e lixiviação da superfície nanoestruturada com a deposição do analito.

A sua estrutura (Figura 9, página 37) é composta por vários grupos hidroxila capazes de aderir à superfície do vidro ativada por interações eletrostáticas e permite, desta forma, a deposição e interação das NPM de forma homogênea para o recebimento do analito alvo (GOULET et al, 2005; RAJ & SUDARSANAKUMAR, 2017).

Na Figura 14 está apresentado o espectro Raman do primeiro filme de botriosferana confeccionado sobre as placas de vidro tratadas, obtido no comprimento de onda (λ) de 532 nm e tempo de aquisição (t) igual a 1s.

Figura 14 – Espectro Raman do filme de botriosferana *in natura* sobre lâmina de vidro ($\lambda = 532$ nm / t = 1s).



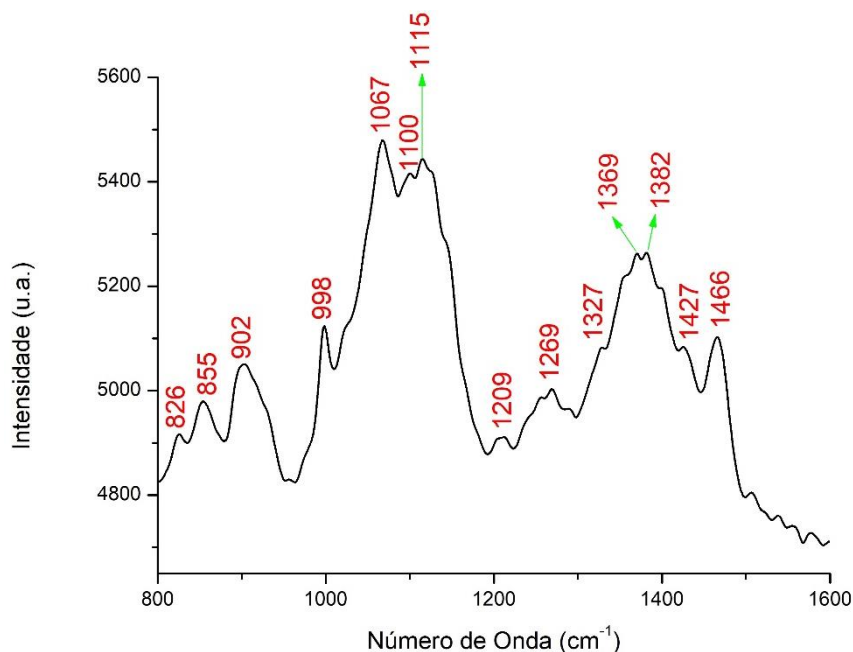
Fonte: autoral

É possível observar a manifestação do fenômeno de fluorescência no espectro proveniente da emissão do filme de botriosferana, devido à alta intensidade apresentada da única banda alargada. Este fato impossibilitou a obtenção das bandas Raman características do biopolímero e sua efetiva caracterização nessa radiação excitante.

Foi considerada a possibilidade de que possa ocorrer uma pequena contaminação do substrato por proteínas do meio de cultivo da fermentação, presente em uma certa porcentagem na solução do biopolímero que foi utilizada para confecção dos filmes (BARBOSA et al, 2003). Essa é uma potencial causa da alta fluorescência evidenciada no espectro da Figura 14, que proteínas possam agir como impurezas presentes nas amostras, que mesmo em baixas concentrações possam ser responsáveis por essa limitação na análise do filme (De FARIA et al, 2002).

Na intenção de caracterizar o filme de botriosferana depositado na superfície da placa de vidro, para confirmar a presença do biopolímero antes da deposição das NPM o método de desproteínização foi aplicado na solução bruta. O espectro Raman da Figura 15 foi obtido a partir de um filme de botriosferana desproteínizada.

Figura 15 – Espectro Raman do filme de botriosferana desproteínizada sobre lâmina de vidro ($\lambda = 785 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$).

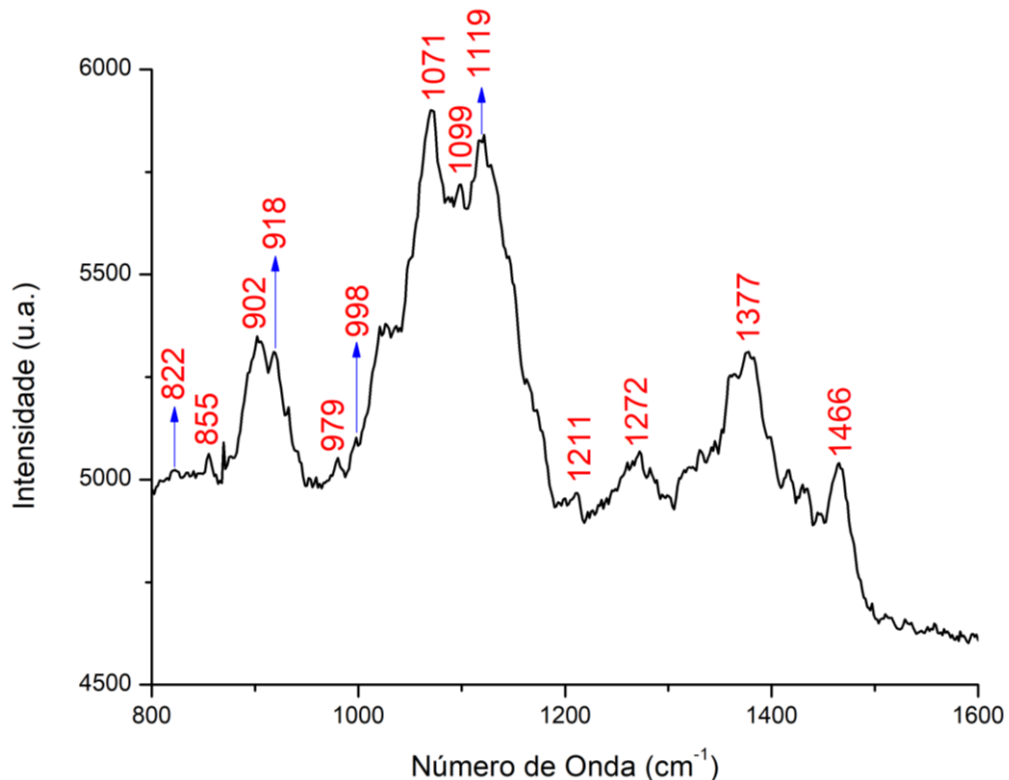


Fonte: autoral

As condições de obtenção desse espectro se deram exclusivamente na irradiação com laser em 785 nm. Não foi possível a obtenção do espectro da botriosferana utilizando laser com comprimento de onda no 532 nm, pois mesmo com o melhoramento na resolução do espectro, resultado da desproteção, a fluorescência ainda dificultava as análises no Raman normal para essa molécula nessa condição, visto que em menores comprimentos de onda a energia de excitação é maior, o que favorece a interferência da fluorescência na amostra (De FARIA et al, 2002).

As bandas obtidas no filme da Figura 15 estão de acordo com as bandas encontradas no espectro Raman do biopolímero sólido (antes da solubilização para formação do filme) apresentado na Figura 16. As regiões indicadas no espectro referem-se às principais bandas para caracterização da botriosferana.

Figura 16 – Espectro Raman da botriosferana sólida desproteção ($\lambda = 785 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$).



Fonte: autoral

A atribuição das bandas relacionadas ao biopolímero sólido e em filme é mostrada na Tabela 1. De acordo com a estrutura da molécula de botriosferana (Figura 9, página 37) pode-se relacionar os números de onda provenientes do espectro para caracterização do filme obtido na placa de vidro.

A banda em 826 cm^{-1} no espectro do filme de botriosferana corresponde ao estiramento da ligação C-OH (SYNYTSYA et al, 2003) referente aos átomos de carbono dos anéis e às hidroxilas existentes na estrutura.

A banda em 855 cm^{-1} corresponde à estrutura cíclica dos monômeros e caracteriza o estiramento das ligações C-C no anel, pois admite-se na região de 700 à 950 cm^{-1} a presença de bandas anoméricas, assim como estiramento da ligação C-C (MROZEK & WEAVER, 2002). Em 902 cm^{-1} pode-se observar a deformação no plano da ligação C-H, referente ao hidrogênio na posição axial ligado ao carbono anomérico de cada monômero do biopolímero, devido à presença da ligação glicosídica na posição β (MANGOLIM et al, 2017). Essas informações, retiradas do espectro obtido, confirmam a estrutura da botriosferana como sendo um tipo de β -glucana, como mencionado inicialmente.

Tabela 1 – Atribuição das bandas do espectro Raman da Botriosferana.

Bandas (cm^{-1}) Botriosferana sólida	Bandas (cm^{-1}) Filme de botriosferana	Ligações
822	826	C-OH (ν) _{anel}
855	855	C-C (ν_s) _{anel}
902	902	C-H (δ)
998	998	C-C-H (ν_{as}), C-C-O (δ)
1071	1067	C-C, C-O (ν)
1099	1100	C-O-C (ν_s)
1119	1115	C-O-C (ν_{as})
1211	1209	C-C-H
1272	1269	CH ₂ -OH (cadeia lateral)
1377	1382	CH ₂ -OH (δ)
1466	1466	CH ₂ (τ)

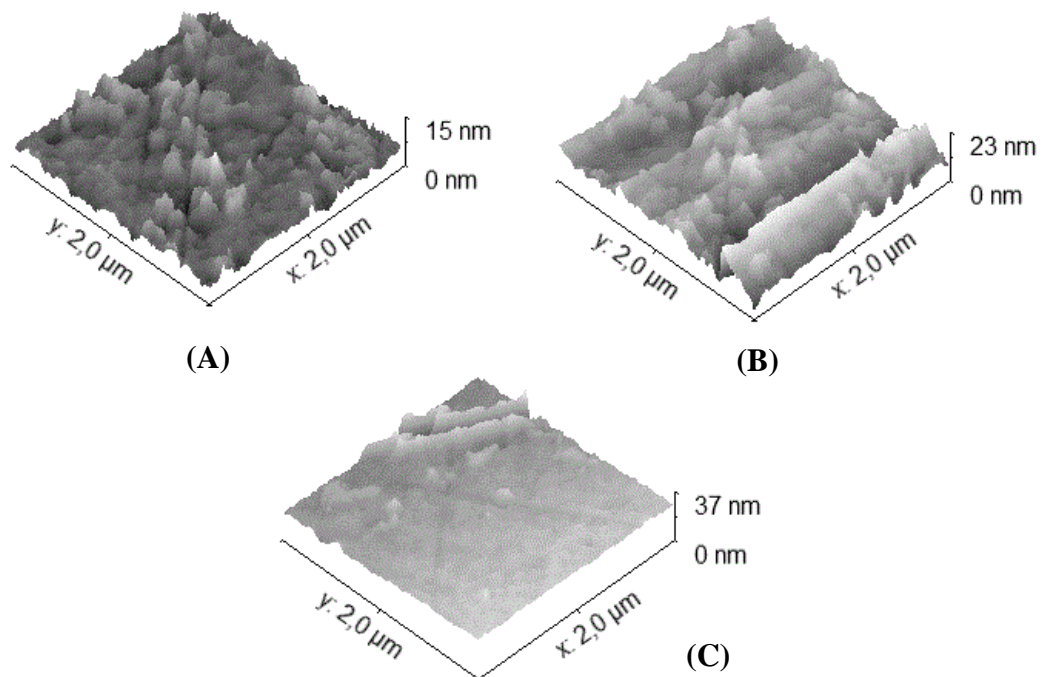
Em 1067 cm^{-1} aparecem os modos de vibração referentes ao estiramento simétrico das ligações C-C e C-O do anel, que encontram-se no intervalo entre 950 - 1200 cm^{-1} característico de polissacarídeos (WIERCIGROCH et al, 2017). Da mesma forma, as bandas em 1100 e 1115 cm^{-1} são características do estiramento simétrico e assimétrico, respectivamente, do conjunto C-O-C da ligação glicosídica

(SYNYTSYA et al, 2003 e COLTHUP et al, 1990). Em 1209 cm^{-1} e 1269 cm^{-1} são observadas as vibrações das ligações C-C-H e CH_2OH , respectivamente. A vibração referente ao grupamento CH_2OH trata-se dos álcoois primários do polissacarídeo e acontece no plano da molécula (MANGOLIM et al, 2017).

As vibrações que resultaram em números de onda de 1382 cm^{-1} e 1466 cm^{-1} correspondem à deformação no plano de CH_2OH e à torção angular de CH_2 , respectivamente (MANGOLIM et al, 2017). Esses resultados, correspondentes às bandas aparentes no espectro Raman do filme de botriosferana, concordam com as bandas existentes no espectro Raman do biopolímero sólido e apresentam poucas modificações em termos do deslocamento de bandas.

Esses resultados indicam que é possível manter a estrutura do biopolímero inalterada mesmo em forma de filme e ainda possibilita a exploração de suas propriedades químicas e físicas como suporte para receber as nanopartículas de metais sobre sua superfície. Esta afirmação é corroborada pelas imagens provenientes das análises de microscopia de força atômica (AFM) realizadas com o filme de botriosferana, que apresentam na Figura 17 a topologia da superfície do filme do polissacarídeo em termos de rugosidade nanométrica.

Figura 17 – Imagens da AFM do filme de botriosferana *in natura*.



Fonte: autoral

É possível observar a irregularidade da superfície do material que apresenta uma rugosidade heterogênea em diferentes regiões do filme, inclusive em relação à espessura, que varia de 15 a 37 nm. Isto pode influenciar de forma positiva ou negativa na resposta dos espectros SERS obtidos das moléculas sondas analisadas.

Uma intensificação substancial pode ser observada quando o analito for adsorvido nas regiões mais rugosas, visto que as nanopartículas que foram depositadas na superfície da botriosferana acompanham o relevo do seu filme e o plasmon de ressonância é mais concentrado nessas áreas, ou pode resultar em sinais Raman pouco intensos, ou nenhum sinal, quando os mesmos analitos forem adsorvidos em regiões pouco rugosas, diminuindo a sensibilidade de detecção do substrato confeccionado. Os valores médios de rugosidade das imagens obtidas são apresentados na Tabela 2 e os valores que variam de 1,4 a 2,7 nm permitem caracterizar o filme de botriosferana como um material de baixa rugosidade devido aos baixos valores encontrados para a área analisada.

Tabela 2 – Dados obtidos das análises de AFM em diferentes regiões do filme de botriosferana.

Amostras	Espessura (nm)	Rugosidade RMS (nm)	Tamanho médio grãos (nm)	Área media grãos (nm ²)
A	15	1,448 (\pm 0,4533)	7,825	61,27
B	23	1,792 (\pm 0,3125)	7,838	61,52
C	37	2,723 (\pm 1,407)	7,865	62,03

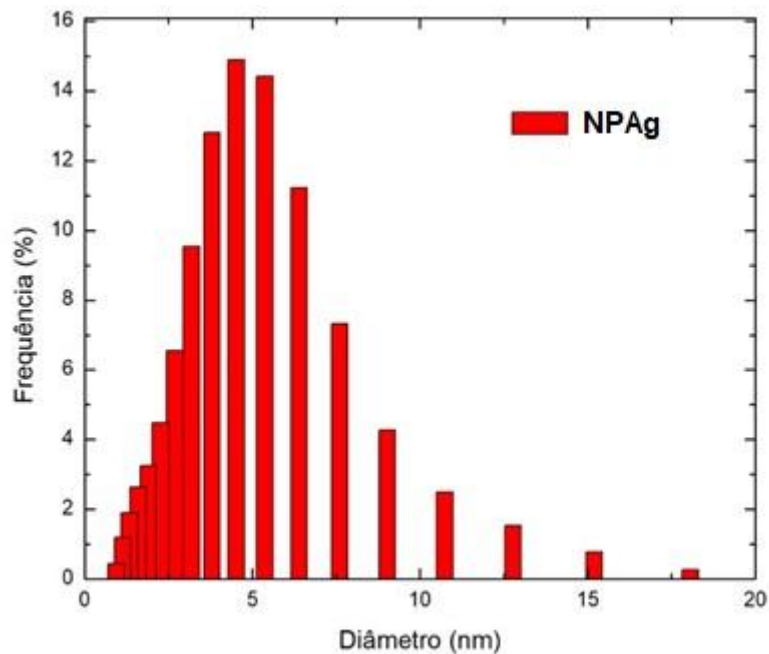
Essa irregularidade observada do filme de botriosferana obtido já era esperada, visto que a técnica de deposição *casting* não garante uma homogeneidade na formação do filme, porém não é prejudicial para manifestação do efeito SERS, visto que o material apresenta boas propriedades adsorventes que podem levar à formação de *clusters* de nanopartículas na superfície do polissacarídeo e pré-concentração do analito nas proximidades destes *clusters*, onde o campo eletromagnético é mais intenso.

As nanopartículas de prata (NPAg) e ouro (NPAu) sintetizadas por ablação a laser, e posteriormente depositadas e estabilizadas sobre o filme de botriosferana, foram previamente analisadas pela técnica de espalhamento dinâmico

da luz (DLS). Os resultados dessas análises são apresentados nas Figuras 18 (NPAg) e 19 (NPAu).

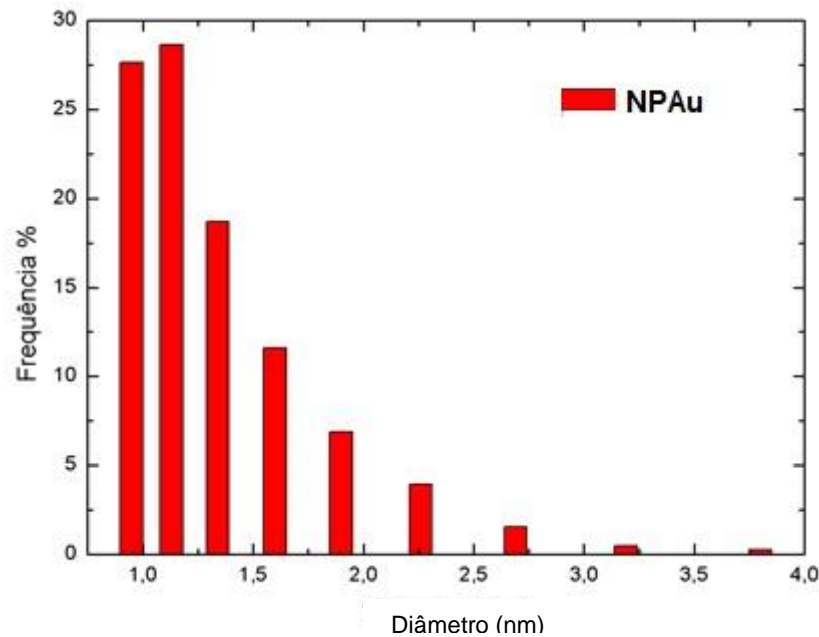
O espalhamento dinâmico da luz é uma técnica utilizada para definir as dimensões de nanopartículas em suspensão. O método consiste na medida dessas dimensões levando em consideração o movimento Browniano das partículas e a intensidade da luz espalhada por elas. O movimento Browniano é inversamente proporcional ao tamanho da partícula e o tempo em que o sinal começa a cair durante a análise de uma amostra é usado para estimar o seu tamanho (De OLIVEIRA, 2013).

Figura 18 – Distribuição dos diâmetros das NPAg analisadas por DLS.



Fonte: autoral

Figura 19 – Distribuição dos diâmetros das NPAu analisadas por DLS.



Fonte: autoral

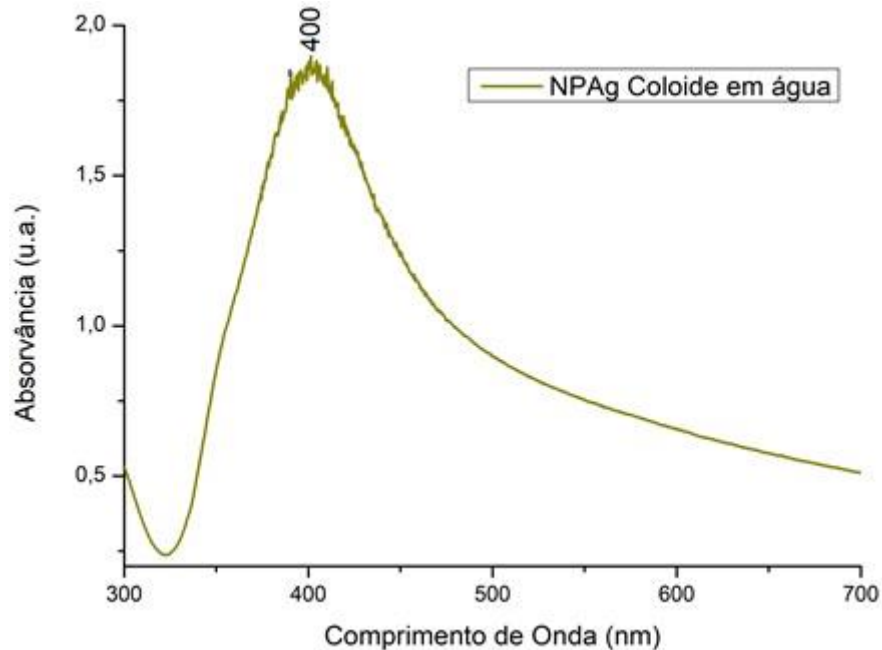
Nas suspensões de prata e ouro coloidal é possível observar pelos gráficos de distribuição dos diâmetros, obtido pela técnica do DLS obtido (Figura 18 e 19, respectivamente) que as nanopartículas apresentam uma contribuição de maior frequência para o diâmetro analisado de 5 e 1,2 nm, respectivamente, visto que estes são os picos de maior frequência existentes nos gráficos. É possível registrar ainda a presença de polidispersividade das nanopartículas pois, mesmo em menor concentração, diferentes tamanhos de nanopartículas presentes na solução coloidal obtida a partir da síntese de ablação a laser são observáveis nos gráficos DLS. (SIKDER et al, 2016).

Os maiores diâmetros das NPs dos dois coloides (NPAg e NPAu), mesmo não atribuindo especificidade à síntese de maneira efetiva, contribuem para a aplicação dessas nanopartículas na montagem de substratos SERS, visto que, quanto maior a partícula melhor a sua contribuição no espalhamento da luz incidente, o que aumenta o campo eletromagnético sentido pelo analito de interesse e pode levar à formação de *hot-spots* valiosos na superfície do biopolímero.

Outra característica interessante dessas nanopartículas refere-se à sua forma. Essa informação é dada pela banda de absorção obtida na análise de espectrometria de UV-vis mostrada na Figura 20, que confirma a efetividade da

síntese das NPAg devido à presença da banda de absorção em 400 nm, referente ao seu plasmon de superfície.

Figura 20 – Espectro de absorção UV-vis do coloide de NPAg.

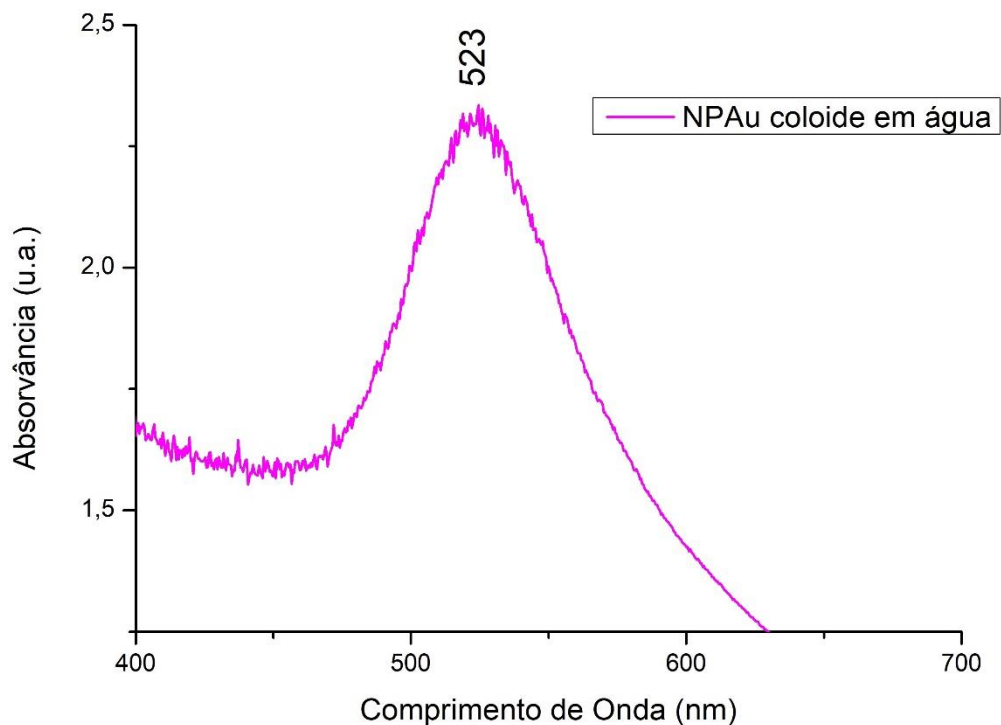


Fonte: autoral

A banda de absorção do espectro que se concentra em 400 nm é característica de NPAg de formato esférico. Ela confirma a presença de prata coloidal na suspensão obtida, mostrando a eficiência da ablação a laser na síntese de nanopartículas puras de prata, pois não existem desvios da banda de absorção ou o aparecimento de novas bandas em regiões diferentes (SANGHI & VERMA, 2009; BHUI et al, 2009; CHEN & LU, 2010).

O espectro de absorção UV-vis da solução coloidal de nanopartículas de ouro apresentou banda em 523 nm (Figura 21).

Figura 21 – Espectro de absorção UV-vis da solução de NPAu.



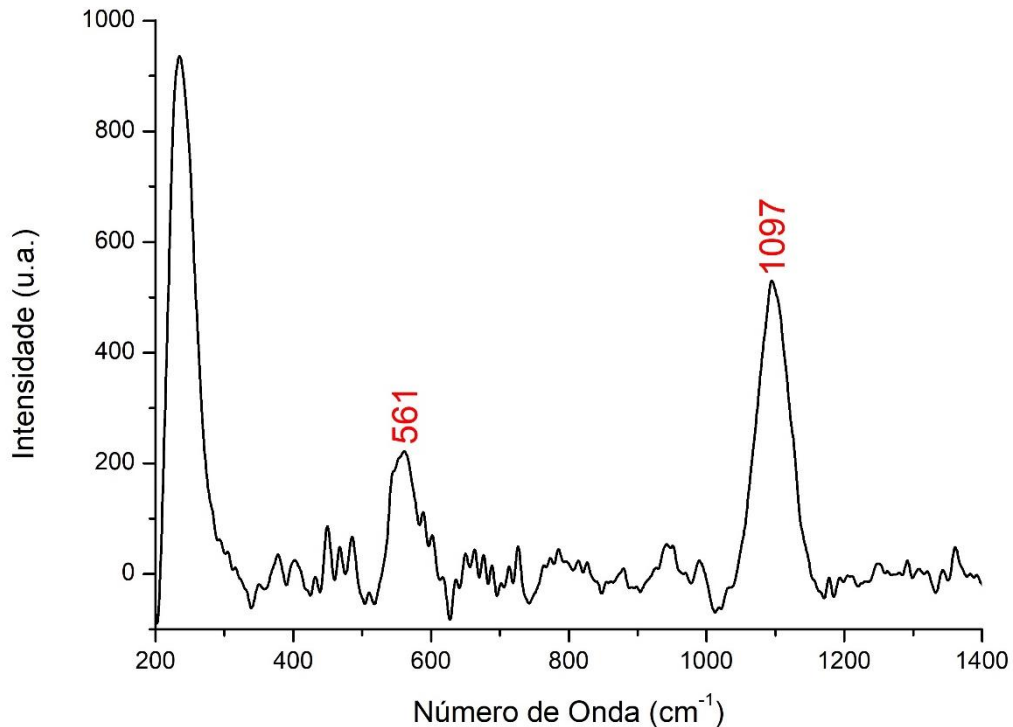
Fonte: autoral

A banda em 523 nm é característica de nanopartículas de ouro esféricas, mostrando a eficiência do método de síntese na obtenção de NPAu puras (CHEN et al, 2008; WANG et al, 2014; MIZUTANI et al, 2015; ROHIT et al, 2016; TANG et al, 2018).

Os primeiros espectros Raman obtidos pelo uso dos substratos permitiram avaliar o potencial das nanopartículas de ouro immobilizadas no filme do polissacarídeo botriosferana em superfície de vidro (BNPAu). Este constituiu o primeiro substrato confeccionado neste trabalho e dispôs do aminoácido cisteína como molécula sonda, devido a presença dos grupos sulfidril (-SH) e amina (-NH₂) em sua estrutura. Segundo a teoria de ácidos duros e macios de Pearson, estes grupos funcionais apresentam boa interação com o ouro.

As análises dessas amostras no Raman não resultaram em nenhum espectro característico da cisteína depositada, tampouco do biopolímero que foi utilizado na montagem do substrato. O espectro Raman mostrado na Figura 22 apresenta apenas bandas características do vidro, suporte do substrato.

Figura 22 – Espectro Raman do filme de botriosferana coberto com NPAu e cisteína (BNPAu) ($\lambda = 785 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$).



Fonte: autoral

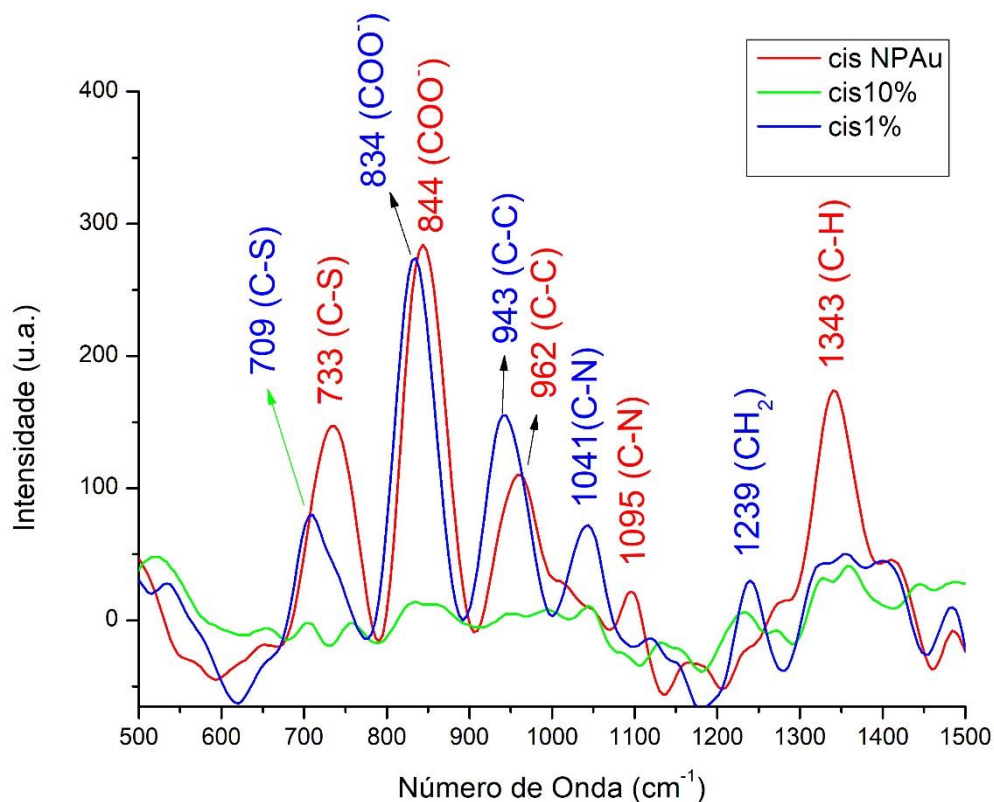
As bandas correspondentes em 561 cm^{-1} e 1097 cm^{-1} são características da deformação no plano da ligação O-Si-O e estiramento da ligação Si-O, respectivamente (NAKAMOTO, 1997). Assim, há evidências de que as deposições realizadas para a formação do filme proposto não foram efetivas em cobrir toda a placa de sílica e favoreceram a formação de um filme não-homogêneo.

A fim de evitar a aparição dessas bandas características do vidro, mais camadas da solução do biopolímero foram aplicadas, assim como do coloide de NPAu. Mesmo com a aplicação de mais camadas, a molécula sonda não foi detectada no substrato proposto e não foi possível obter espectros SERS da cisteína utilizando as nanopartículas de ouro nessas condições.

Para melhor investigar os fatores responsáveis pela inadequação do substrato composto pelo biopolímero coberto com NPAu, novos substratos compostos apenas de NPAu foram confeccionados. Foi utilizada a mesma técnica de deposição (*casting*) aplicando a cisteína misturada à solução coloidal de NPAu sobre a superfície

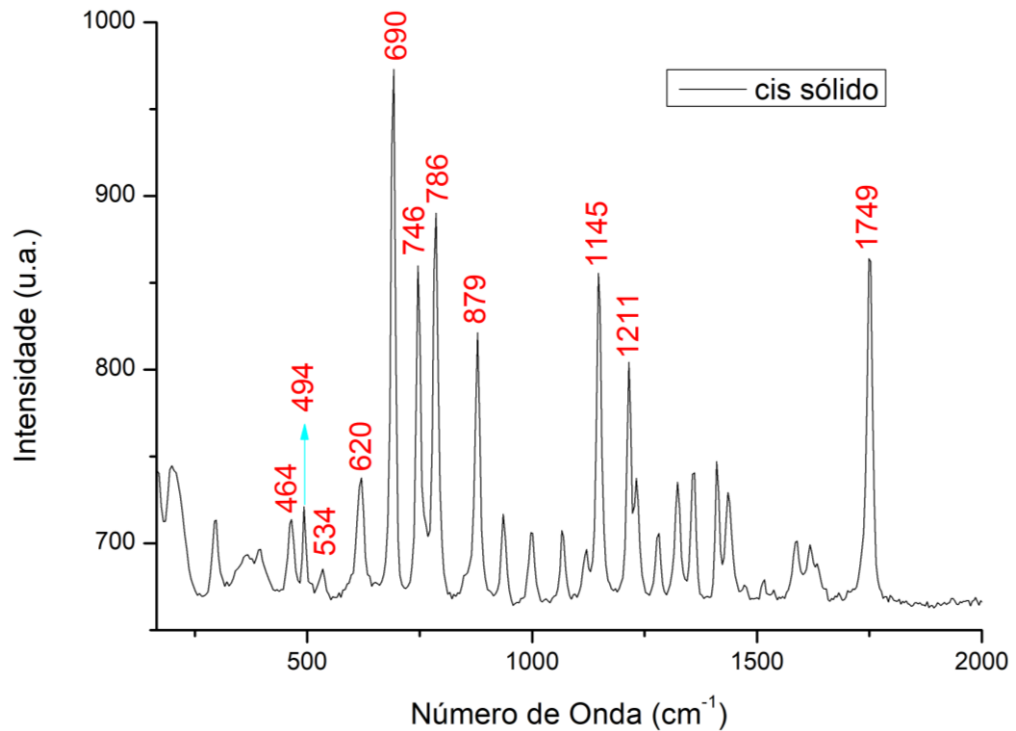
do vidro. Os espectros Raman obtidos são observados na Figura 23 e são comparados com o espectro da cisteína sólida na Figura 24.

Figura 23 – Espectros Raman da cisteína em diferentes concentrações na presença de solução coloidal de NPAu (cis NPAu) e sobre um filme de NPAu depositado sobre o vidro (cis 10% e cis 1%) ($\lambda = 785 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$).



Fonte: autoral

Figura 24 – Espectro Raman da cisteína sólida. ($\lambda = 785 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$)



Fonte: autoral

É possível observar nos resultados obtidos (Figura 23) que os espectros sobrepostos apresentam intensidade menor para as bandas de cisteína quando comparado ao espectro da cisteína sólida (Figura 24) e que não houve intensificação das bandas aparente. A possível evidência de um fenômeno SERS nessas análises está fundamentada no deslocamento das bandas, evidenciadas nos espectros obtidos.

Há sobreposições nas bandas das duas amostras referentes à solução de cisteína 10% (m/v) misturada na solução coloidal de NPAu (linha de coloração vermelha) e à solução de cisteína 1% (m/v) aplicada na placa de vidro com o filme de NPAu (linha de coloração azul). Mesmo que as bandas apresentem um certo deslocamento e intensidades variadas, as atribuições na Tabela 3 correspondem às mesmas vibrações de ligação.

Tabela 3 – Atribuições das bandas do espectro Raman e SERS da cisteína nas diferentes amostras analisadas.

Cisteína sólida (cm⁻¹)	Cis NPAu (cm⁻¹)	Cis 1% (cm⁻¹)	Ligações
464	-	-	CCN (δ)
494	-	-	NH ₃ ⁺ (τ)
534	-	-	COO ⁻ (rock)
620	-	-	C-C (ν)
690	733	709	C-S (ν)
746	-	-	CH ₂ (rock)
786	844	834	COO ⁻ (w)
879	962	944	C-C (ν)
-	1095	1041	NH ₃ ⁺ (rock)/CCN(ν)
1145	-	-	C-H (δ)
1211	-	1239	CH ₂ (τ)
1749	-	-	S-H (ν)

- Onde, Cis NPAu = cisteína em solução de NPAu, Cis 1% = solução de cisteína 1% depositada no filme de NPAu.

A linha verde da Figura 23, correspondente à solução de cisteína 10% (m/v) que foi aplicada no filme de NPAu, não apresentou bandas características da cisteína. Possivelmente devido a saturação do detector pela quantidade de sólido depositada no substrato analisado, impossibilitando a obtenção de espectro e detecção da molécula de cisteína.

Porém, infere-se que a causa da baixa intensificação apresentada nos espectros da Figura 23 (Cis 1% e Cis NPAu) para a molécula de cisteína seja proveniente da desestabilização do sistema nanoestruturado, talvez pela ocorrência do fenômeno de aglomeração das NPAu. Este evento provoca uma intensificação seletiva dos modos vibracionais do ligante, o que explica a modificação do espectro com o aparecimento de apenas algumas bandas características da molécula de cisteína (MOORES & GOETTMAN, 2006).

Essa aglomeração foi identificada durante a preparação do substrato, onde observou-se uma mudança na coloração da solução da NPAu do rosa para o azul quando o analito era adicionado, o que, segundo a literatura, evidencia a ocorrência desse fenômeno (QUITEN, 2001; GHOSH et al, 2004; MOORES & GOETTMAN, 2006; TOOMA et al, 2007).

O ambiente químico é eletronicamente modificado neste fenômeno, pois a interação com a cisteína pode provocar mudança no potencial dielétrico do meio, o que conseqüentemente é um dos fatores, além da composição, forma, tamanho e carga, que têm influência direta sobre o plasmon de ressonância, responsável pela manifestação do efeito SERS desse sistema. O material responde a essa alteração deslocando sua banda de absorção para o azul (evidenciado pela coloração apresentada depois do contato com o analito, de forma qualitativa), e o mesmo é diminuído a medida que a proximidade entre as nanopartículas é aumentada, resultando em espectros SERS com baixa intensidade e falta de reprodutibilidade. (QUITEN, 2001; GHOSH et al, 2004; MOORES & GOETTMAN, 2006; TOOMA et al, 2007).

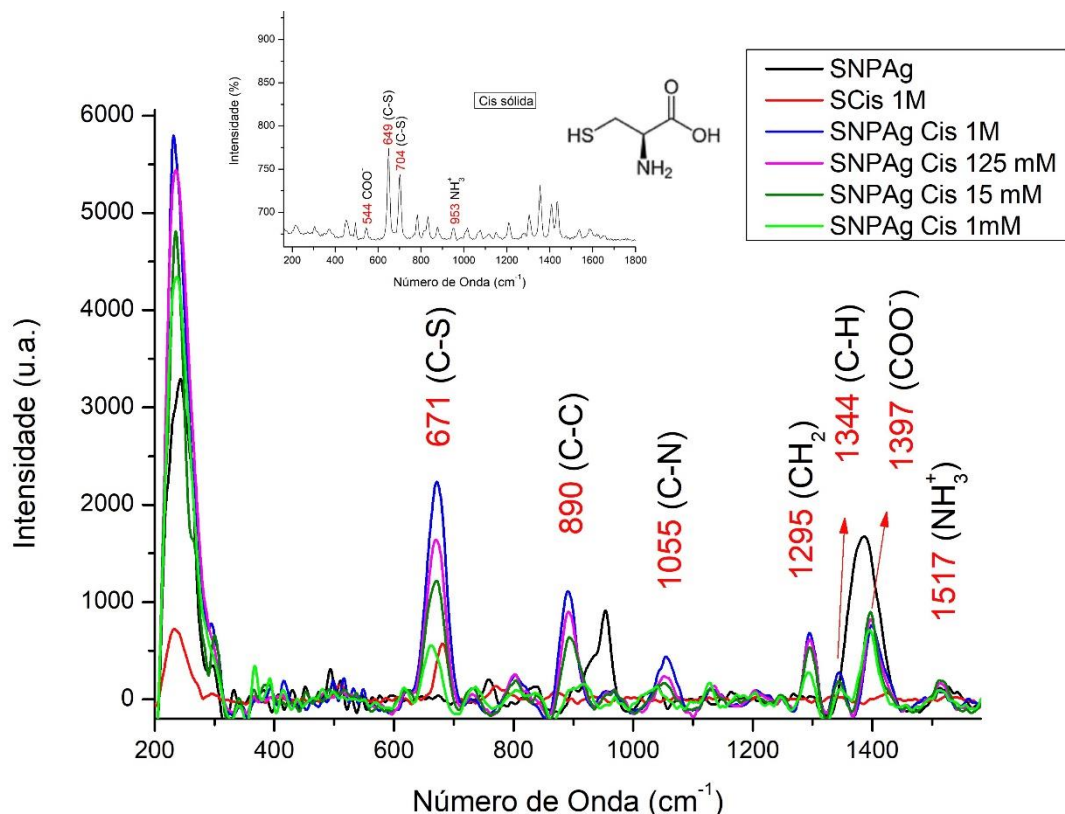
As bandas que caracterizam a cisteína nos espectros obtidos (Figura 23) estão presentes em 733 cm^{-1} e 709 cm^{-1} referentes ao modo vibracional de estiramento da ligação C-S, para a cisteína 1% depositada sobre o filme de NPAu e para a cisteína em solução de NPAu, respectivamente. Essas bandas evidentes corroboram com a literatura, que apresenta bandas para a ligação C-S da cisteína com NPAu em regiões que variam de 630 cm^{-1} a 720 cm^{-1} e caracterizam um mecanismo de adsorção da molécula pelo grupo sulfidril. Existe uma afinidade de Pearson entre o átomo de enxofre e a nanopartícula de ouro, e um deslocamento é evidenciado em comparação com a banda em 690 cm^{-1} no espectro da cisteína sólida (HUHEEY et al, 1993; MIESSLER et al, 2014; PODSTAWKA et al, 2005 e DOURADO et al, 2016).

A intensificação das bandas em 844 cm^{-1} e 834 cm^{-1} nos dois espectros sobrepostos, referentes ao estiramento do grupo COO^- , também é pronunciada nessas condições e evidencia que a forma como a cisteína está adsorvida na superfície nanoestruturada leva a uma possível proximidade desse grupo com a superfície da nanopartícula de ouro (PODSTAWKA et al, 2005).

Em virtude da desestabilização das NPAu citada anteriormente, fator que possivelmente comprometeu a reprodutibilidade de espectros SERS de cisteína utilizando substratos de NPAu, e diante da dificuldade de se obter NPAu com diâmetros maiores, que possivelmente colaborariam com a formação de plasmons mais estáveis, voltou-se a atenção para substratos SERS compostos pela botriosferana coberta com NPAg, cujas nanopartículas puderam ser sintetizadas com diâmetro médio maior.

Essa característica poderia contribuir para formação de plasmons de ressonância mais estáveis, podendo levar à menor interferência nas intensificações dos espectros obtidos com a adição do analito, levando à obtenção de espectros reprodutíveis. Inicialmente, para testar a capacidade do coloide de prata na detecção de cisteína, foram obtidos espectros Raman das soluções contendo as misturas de diferentes concentrações do aminoácido (cisteína) com colóide de NPAg (SNPAg) (Figura 25).

Figura 25 – Espectros SERS da cisteína em solução coloidal de nanopartículas de prata. No *insert*, espectro Raman da cisteína sólida ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$).



Fonte: autoral

- Onde, SCis 1M = solução de cisteína 1,0 mol.L⁻¹; SNPAg Cis 1M = solução de cisteína 1 mol.L⁻¹ c/ NPAg; SNPAg Cis 125,0 mM= solução de cisteína 125,0 mmol.L⁻¹ c/ NPAg; SNPAg Cis 15,0 mM= solução de cisteína 15,0 mmol.L⁻¹ c/ NPAg; SNPAg Cis 1mM= solução de cisteína 1 mmol.L⁻¹ c/ NPAg.

A interação da cisteína em solução com as NPAg resultou na intensificação do seu sinal Raman (Figura 25), que pode ser comparado com o sinal obtido para a molécula de cisteína no estado sólido (*insert* na Figura 25).

A banda mais intensa dos espectros é a de 671 cm⁻¹, característica do estiramento simétrico da ligação C-S, que indica interação do grupo sulfidril da cisteína com a superfície da nanopartícula de prata. Não há evidências de ligação covalente, pois nenhuma banda presente no espectro caracteriza vibrações de ligação Ag-S em solução (STEWART & FREDERICKS, 1999; NYDIA et al, 2014; OCWIEJA et al, 2017; CHIDAMBARAM et al, 2017).

Outras bandas encontram-se em 890 cm⁻¹, característica do estiramento da ligação C-C, e em 1055 cm⁻¹, onde a vibração do tipo *rocking* da ligação C-N é evidenciada. Em 1295 cm⁻¹ os modos de vibração do tipo *wagging* (w) referentes ao CH₂ se manifestam, assim como vibração do tipo *rocking* em 1344 cm⁻¹ da ligação C-H, estiramento simétrico do grupo COO⁻ em 1397 cm⁻¹ e deformação no plano simétrico do grupo NH₃⁺ em 1517 cm⁻¹ (JIN & FANG, 2007; NASCIMENTO et al, 2014; NYDIA et al, 2014; OCWIEJA et al, 2017; CHIDAMBARAM et al, 2017).

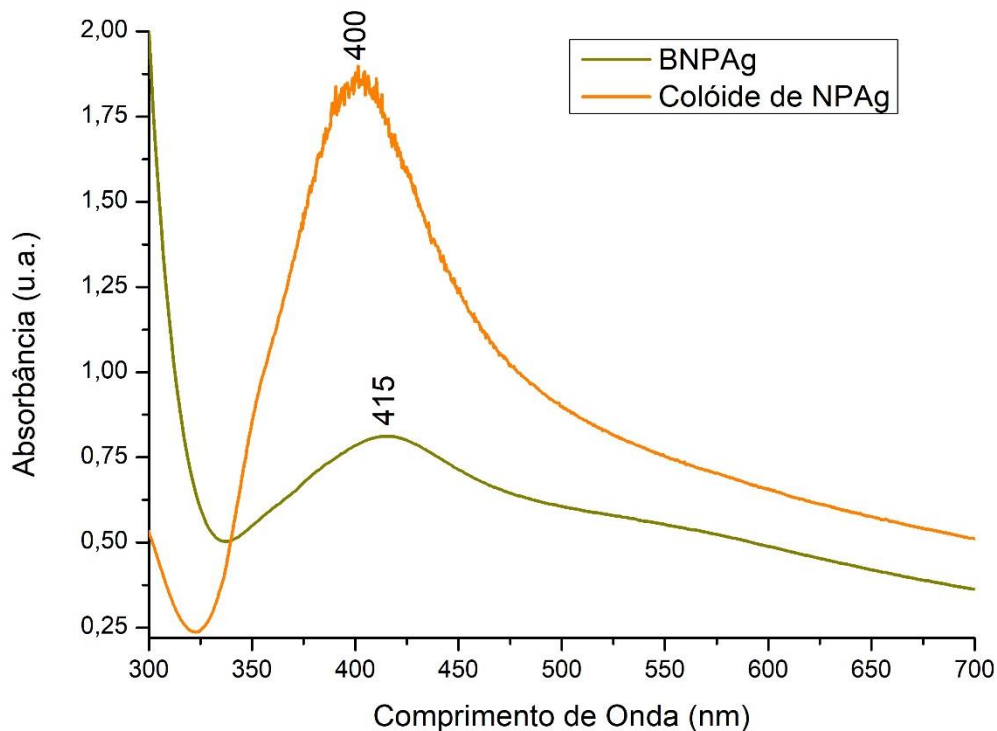
As atribuições das bandas estão em conformidade com a literatura, em trabalhos que avaliam a capacidade das NPAg de atuarem como substratos SERS para detecção de moléculas biológicas. Para essa aplicação, as NPAg sintetizadas por ablação a laser mostraram-se satisfatórias em termos qualitativos, por permitirem, além da detecção da cisteína na solução, a caracterização dos grupos existentes na molécula a partir das bandas obtidas no espectro Raman.

Os resultados obtidos indicam a possibilidade de quantificação da cisteína utilizando a técnica de espalhamento Raman Intensificado pela Superfície (SERS). As medidas das amostras em diferentes concentrações resultaram na diminuição da intensidade das bandas do espectro de cisteína de forma proporcional às concentrações decrescentes analisadas. Confere-se assim a essas NPAg o potencial de compor um substrato com a botriosferana, a fim de melhorar ainda mais os sinais dos espectros Raman da cisteína.

Três fatores consistentes operariam neste novo cenário: a intensidade do plasmon de ressonância do metal, a maior interação entre substrato e NPAg e a pré-concentração do analito sobre a superfície sólida.

Com os estudos preliminares realizados e a obtenção dos espectros de cisteína no coloide de prata de forma estável, reproduzível e eficiente, substratos tendo como base a botriosferana coberta com NPAg foram confeccionados. As análises de espectrometria no UV-vis (Figura 26) apresentaram evidências da presença das nanopartículas de prata na superfície do biopolímero, com banda em 415 nm, característica de nanopartícula de prata esférica de acordo com os resultados obtidos para solução coloidal da NPAg (Figura 20).

Figura 26 – Espectro de absorção no UV-vis do filme de botriosferana coberto com NPAg sobreposto com o espectro UV-vis da solução coloidal de NPAg.



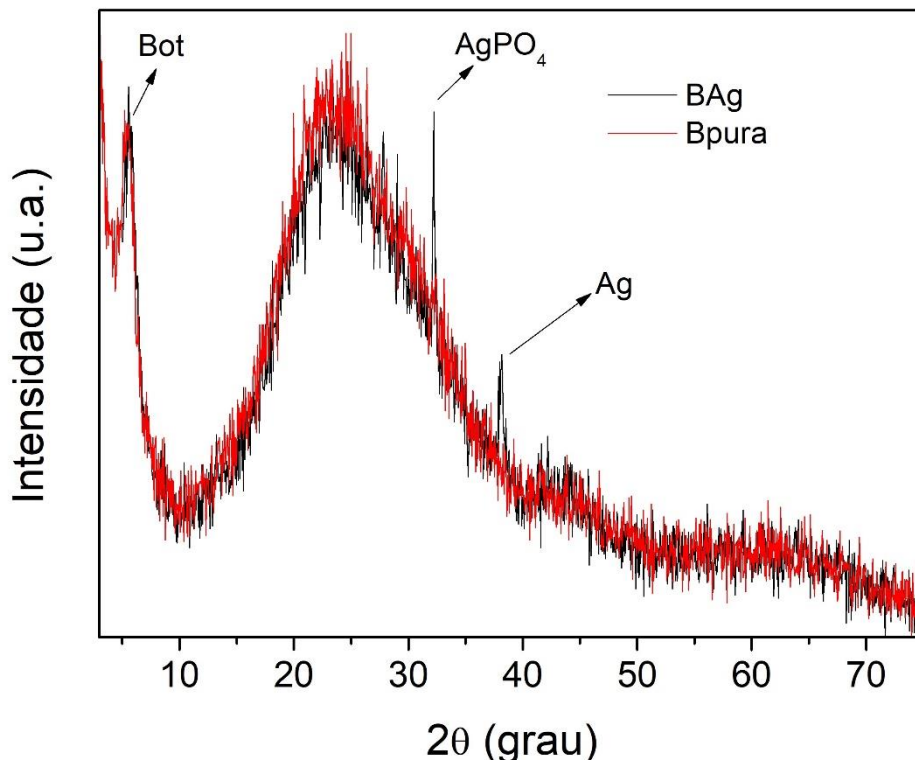
Fonte: autoral

O espectro UV-vis do filme de botriosferana com NPAg apresentou um leve deslocamento com diminuição da absorvância, visto que o espectro da solução coloidal de NPAg apresentou banda em 400 nm, sendo esta mais fina e com absorvância mais pronunciada.

O deslocamento da banda das nanopartículas de prata sobre o filme de botriosferana está de acordo com os efeitos que interferem na observação do plasmon de ressonância, que é consequência da presença de outros componentes misturados às nanopartículas, a qual ocasiona mudança do ambiente químico na superfície da nanoestrutura. Nesse caso, chama-se a atenção para a presença do filme de botriosferana que recebeu a camada de NPAg na sua superfície. Esse resultado comprova a eficiência do revestimento do filme do polissacarídeo com a camada de NPAg de forma homogênea (QUITEN, 2001; GHOSH et al, 2004; MOORES & GOETTMAN, 2006).

Os difratogramas de raios-X para o filme de botriosferana coberto com NPAg podem ser visualizados na Figura 27, que confirmam a presença de prata na superfície.

Figura 27 – Difratogramas de DRX dos filmes de botriosferana e BNPAg sobre superfície de vidro.



Fonte: autoral

- Onde o BAg = Filme Botriosferana com NPAg sobre placa de vidro; Bpura = Filme de

botriosferana sobre placa de vidro; Bot = pico referente a botriosferana; Ag = pico referente a NPAg; Ag_3PO_4 = pico referente ao fosfato de prata.

Picos no difratograma em $2\theta = 38,1^\circ$ e $2\theta = 32,2^\circ$ são característicos das NPAg metálica e fosfato de prata (Ag_3PO_4), respectivamente, com estrutura cristalina, evidenciado pela intensidade e largura dos picos. O fosfato identificado nesse resultado é proveniente do meio de cultivo da botriosferana, que utiliza em sua composição dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) e, quando na presença de prata, possivelmente reagiu, dando origem ao sal (BARBOSA et al, 2003; GIESE et al, 2008; BAYÍON et al, 2016; MAMATHA et al 2017; GHIUTÀ et al, 2018; SALAMANA et al. 2018; PRIMAK et al, 2018).

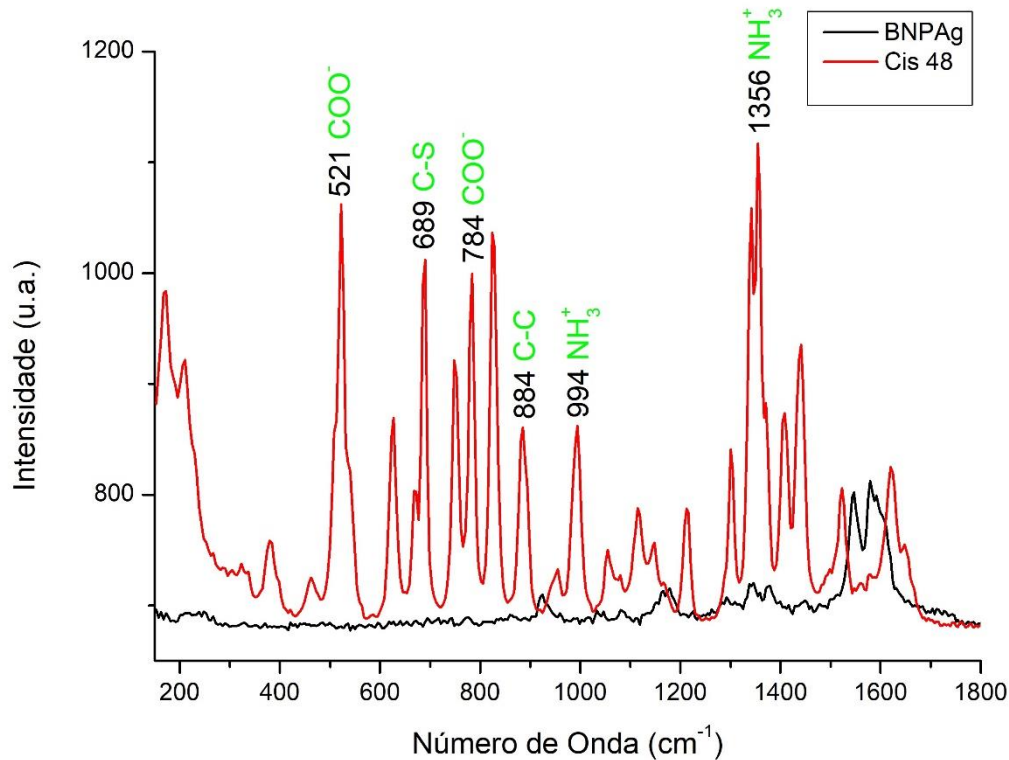
Mesmo após a diálise do polissacarídeo, seguida de liofilização, esse fosfato residual não consegue ser retirado em sua totalidade, possivelmente isso se deve à conformação em tripla-hélice da botriosferana que retém alguns íons PO_4^{3-} em sua parte interna e dificulta sua total eliminação, visto que a botriosferana se enovela após sua secagem (BARBOSA et al, 2003; GIESE et al, 2008).

Em $2\theta = 5,6^\circ$ o pico estreito é possivelmente característico da botriosferana, visto que ele se mantém nos dois difratogramas sobrepostos, atribuindo uma certa cristalinidade de longo alcance para a estrutura do polissacarídeo, com uma distância calculada de $d = 16 \text{ \AA}$ (Equação 1). Compostos inorgânicos sempre apresentam picos com difrações muito maiores e levam a pequenas distâncias interplanares de sua estrutura cristalina, o que corrobora ainda mais para que o pico identificado em $5,6^\circ$ seja característico da estrutura cristalina do polissacarídeo. A banda larga e de alta intensidade presente no difratograma, variando 2θ de 10° à 40° , é característica do vidro e corresponde à região pertencente ao halo amorfo da amostra, visto que a mesma utiliza o vidro como suporte do filme.

As análises da cisteína sobre a superfície do substrato (BNPAg) tiveram como resultado o espectro SERS apresentado na Figura 28.

De forma mais criteriosa, a área de ocupação do substrato na placa de vidro em que foi depositada a cisteína equivale a $0,25 \text{ cm}^2$ e o total de massa nessa superfície corresponde a 12 mg de cisteína. Dividindo pela área destinada a deposição do material, resulta em 48 mg/cm^2 , e equivalente a $2,5 \times 10^{17}$ moléculas de cisteína que contribuem para a intensificação do sinal SERS obtido por cm^2 de substrato.

Figura 28 – Espectro SERS da cisteína (48 mg/cm²) depositada no substrato de botriosferana coberto com NPAg (Cis 48), comparado com o branco (BNPAg) ($\lambda = 532$ nm / t = 10 s)



Fonte: autoral

É possível observar a modificação do espectro da cisteína pré-concentrada no substrato de BNPAg. As bandas mais evidentes são em 521 cm⁻¹, característica de vibração do tipo *rocking* do grupo COO⁻, em 689 cm⁻¹ do estiramento da ligação C-S, vibrações do tipo *wagging* em 784 cm⁻¹ do grupo COO⁻, vibração do tipo *rocking* e deformação do grupo NH₃⁺ em 994 cm⁻¹ e 1356 cm⁻¹, respectivamente, e estiramento da ligação C-C em 884 cm⁻¹ (STEWART & FREDERICKS, 1999; SILVA et al, 2014; NASCIMENTO et al, 2014; NYDIA et al, 2014; OCWIEJA et al, 2017; CHIDAMBARAM et al, 2017).

Nessas condições foi possível a caracterização e detecção da molécula de cisteína, demonstrando a eficiência do substrato proposto. Há evidência do efeito SERS pela modificação do espectro e principalmente pela intensificação de algumas bandas características dos grupos COO⁻. Isto sugere que a molécula seja adsorvida na superfície por esse grupo levando em consideração a intensificação das

bandas características desse grupamento no espectro mostrado na Figura 28, o que difere do mecanismo de adsorção evidenciado com o filme de NPAu que apresentou instabilidade com a presença do analito.

A intensificação SERS para a cisteína nesse substrato foi baixa, levando em consideração que seu fator de intensificação (EF) calculado pela Equação 2 (página 50) resultou no valor igual a 48. Na literatura, um valor de intensificação satisfatório mínimo equivale a 10^3 ordens de grandeza (SKOOG et al, 2007; FAN et al, 2011). A integral da intensidade da banda (I_{SERS} e I_{bulk}) em 521 cm^{-1} correspondente à ligação COO^- foi utilizada nesse cálculo por ter apresentado um aumento considerável da intensidade se comparado ao espectro de cisteína sólido ($m = 48\text{ mg}$) sem a presença do substrato.

A quantidade de moléculas que contribuem para o sinal (N_{SERS} e N_{bulk}) foi encontrada a partir da quantidade de massa utilizada para gerar os espectros por área de substrato para o N_{SERS} e considerando a massa total no N_{bulk} a fim de manter iguais os padrões de comparação e sua interação com o diâmetro do laser incidente na amostra.

Como o valor calculado é aproximado, alguns fatores podem ter influenciado na obtenção de um fator de intensificação tão baixo, como por exemplo, a efetiva adsorção da molécula no substrato e sua distância dos pontos na superfície nanoestruturada em que a rugosidade é mais pronunciada, o que pode garantir uma menor interação com o campo de intensificação na interface analito/substrato, resultando num sinal pouco intensificado com relação ao I_{bulk} .

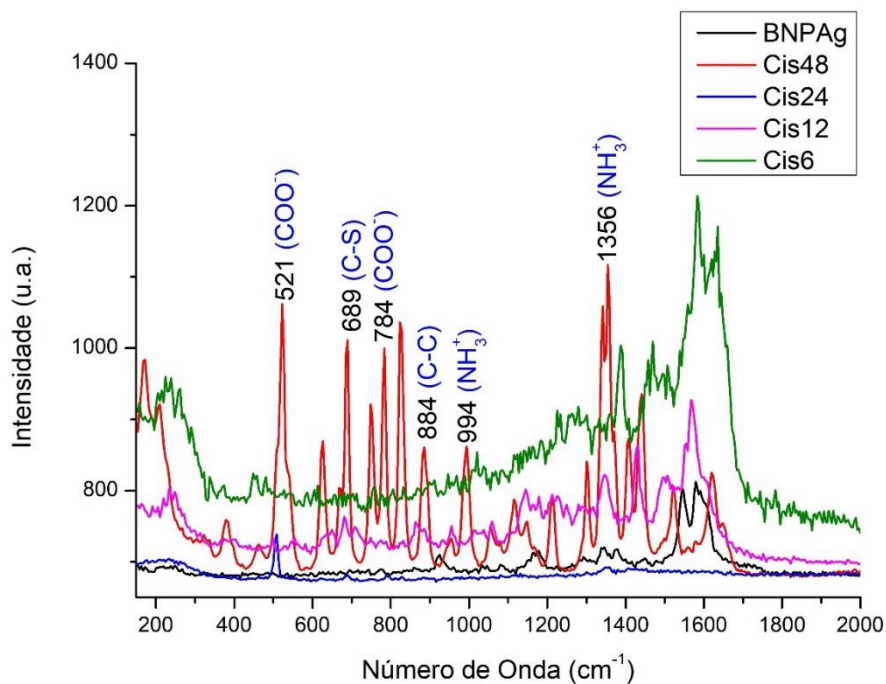
Essa evidência foi citada anteriormente nos resultados obtidos para o AFM (Figura 17), que mostra em suas imagens a irregularidade da superfície do filme de botriosferana quanto à sua rugosidade, e como a camada de NPAg acompanha seu relevo, esse parâmetro influencia diretamente na intensificação do sinal da cisteína nesse substrato.

Em quantidades menores de cisteína não foi possível obter espectros resolvidos e reprodutíveis sobre o substrato BNPAg, o que entra em conflito com a proposta de sensibilidade do efeito SERS, de promover a intensificação das bandas mesmo que concentrações menores sejam analisadas (Figura 29).

Essa instabilidade observada também pode estar relacionada à forma como a molécula sonda interage com a NPAg. Segundo a discussão acima, o grupo

COO⁻ está mais próximo da superfície da NPAg devido a maior intensidade de suas bandas no espectro. Como esse grupo não estabelece uma interação suficientemente estável com a prata (teoria de Pearson ácidos/bases) (HUHEEY et al, 1993; MIESSLER et al, 2014), levando em consideração que a intensificação do sinal SERS é também dependente da interação substrato/analito, é possível que o efeito SERS seja comprometido pela falta de sensibilidade da sonda ao substrato. Soma-se a isso a possível adsorção dessa molécula nas regiões do substrato que apresentam pouca ou nenhuma evidência de plasmon de superfície.

Figura 29 – Espectros Raman da cisteína no substrato de BNPAg com diferentes quantidades de analito. (Cis48 = 48 mg/cm²; Cis24 = 24 mg/cm²; Cis12 = 12 mg/cm²; Cis6 = 6 mg/cm²).



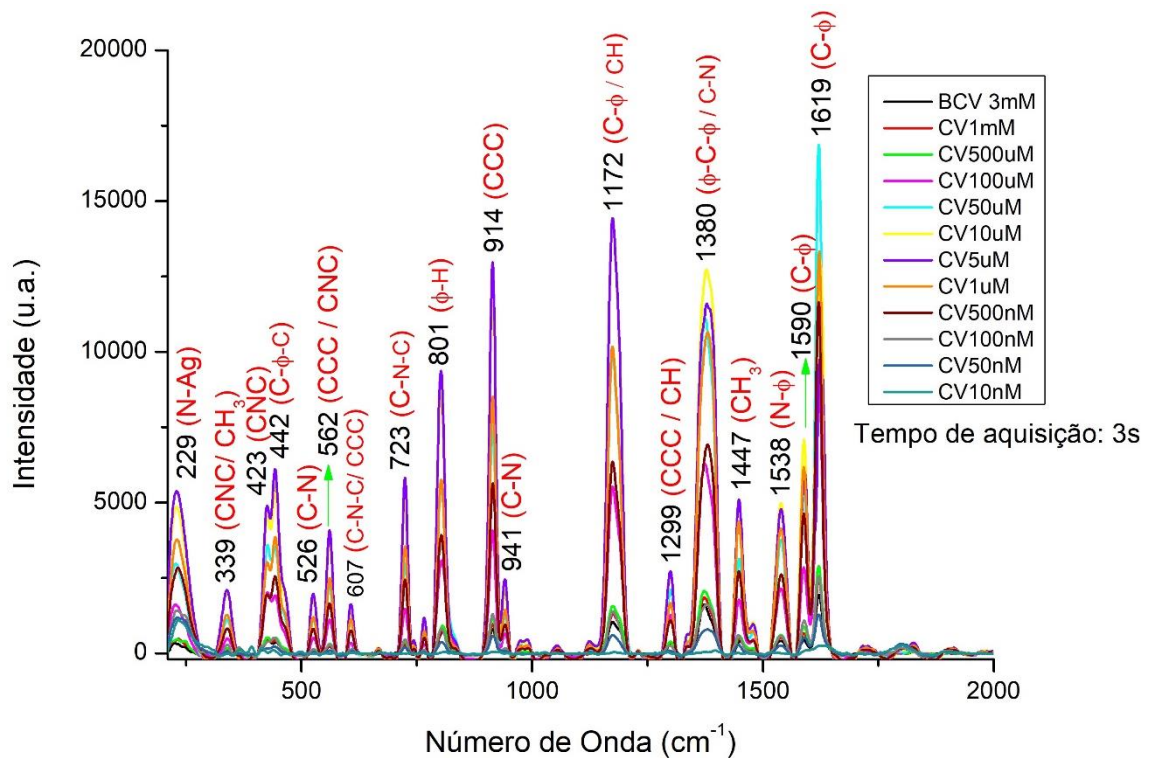
Fonte: autoral

Em virtude dos resultados SERS pouco pronunciados para a cisteína no substrato com NPAg, decidiu-se utilizar o cristal violeta (CV) como molécula sonda. Segundo a literatura, é uma molécula bastante interessante para avaliação do potencial de substratos de nanopartículas de prata. Uma das propriedades mais atraentes dessa molécula é a capacidade de ser adsorvida de forma efetiva por esse substrato, além da sua capacidade Raman Ressonante que colabora com a

diminuição da fluorescência na obtenção dos espectros (LIANG et al, 1995; de SANTANA et al 2006; HARRAZ et al, 2015; ZHU et al, 2018). Os grupos funcionais amina (NR_3) presentes no analito possibilitam uma melhor interação molécula sonda/substrato.

Esta substância foi dissolvida em diferentes concentrações em solução de colóide de NPAg, e os respectivos espectros Raman das amostras foram então obtidos utilizando o tempo de aquisição de 3 s (Figura 30). A atribuição das suas bandas é apresentada na Tabela 4. A faixa de concentrações foi baseada em testes preliminares, realizados a partir de inúmeras diluições até alcançar a concentração onde não se obtiveram sinais evidentes (40 nmol. L^{-1}).

Figura 30 – Espectros SERS de amostras de diferentes concentrações do cristal violeta (CV) em solução de NPAg ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$).



Fonte: autoral

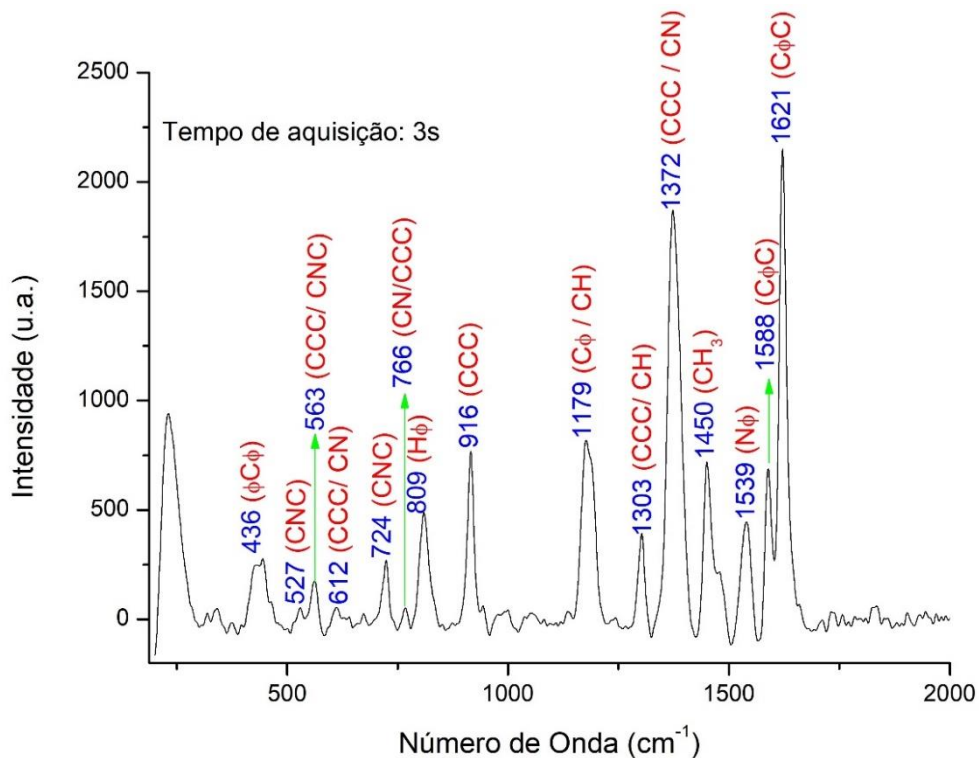
- Onde, BCV = branco da solução de CV à $3,0 \text{ mmol.L}^{-1}$; CV $1,0 \text{ mM}$ = solução de CV em NPAg à $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$; CV $500,0 \text{ }\mu\text{M}$ = solução de CV em NPAg à $500,0 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$; CV $100,0 \text{ }\mu\text{M}$ = solução de CV em NPAg à $100,0 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$; CV $50,0 \text{ }\mu\text{M}$ = solução de CV em NPAg à $50,0 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$; CV $10,0 \text{ }\mu\text{M}$ = solução de CV em NPAg à $10,0 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$; CV

5,0 μM = solução de CV em NPAg à 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; CV 1,0 μM = solução de CV em NPAg à 1,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; CV 500,0 nM= solução de CV em NPAg à 500,0 nmol.L^{-1} ; CV 100,0 nM= solução de CV em NPAg à 100,0 nmol.L^{-1} ; CV 50,0 nM= solução de CV em NPAg à 50,0 nmol.L^{-1} ; CV 10,0 nM= solução de CV em NPAg à 10,0 nmol.L^{-1} .

As bandas observadas nos espectros estão de acordo com os sinais SERS relatados na literatura para o cristal violeta (CAÑAMARES et al, 2008; CHADHA et al, 2013; HARRAZ et al, 2015; ZHU et al, 2018; WEI & HUANG, 2018).

É possível fazer uma comparação dos espectros obtidos nos substratos com o espectro Raman normal da Figura 31, onde se observa a menor intensidade de sinais obtida para a solução de cristal violeta na concentração de 3 mmol.L^{-1} .

Figura 31 – Espectro Raman da solução de cristal violeta (3 mmol.L^{-1}) ($\lambda = 532$ / $t = 3$ s)



Fonte: autoral

Tabela 4 – Atribuição das bandas dos espectros Raman e SERS do cristal violeta.

Bandas Raman normal (cm ⁻¹)	Bandas SERS (cm ⁻¹)	Ligações
-	339	C-N-C / CH ₃ (γ)
-	423	C-N-C (δ)
436	442	C-Φ-C (δ)
527	526	C-N (δ)
-	562	C-C-C (γ) / C-N-C (δ)
612	607	C-N-C (δ) / C-C-C (δ; ν _s)
724	723	C-N-C (ν _s)
766	-	C-N (ν _s) / C-C-C (ν)
809	801	Φ-H (δ)
916	914	C-C-C (δ)
-	941	C-N (ν)
1179	1172	C-Φ/ C-H (δ)
1303	1299	C-C-C _{anel} (ν _{as} ; δ)/ C-H (δ)
1372	1380	Φ-C-Φ / C-N
1450	1447	CH ₃ (δ _{as})
1539	1538	N-Φ (ν) / CH ₃ (δ)
1588	1590	C-Φ (ν)
1621	1619	C-Φ (ν)

A intensificação do sinal Raman do CV em contato com o coloide de NPAg (Figura 30) se dá pela junção dos dois mecanismos mencionados previamente. O efeito plasmon de ressonância da NPAg, devido à movimentação livre dos elétrons na superfície da mesma (aprimoramento eletromagnético), é intensificado pela interação dos átomos de nitrogênio com a superfície da nanopartícula de prata de forma direta, e recebe a contribuição do mecanismo de transferência de carga na intensificação do sinal (De SANTANA, 2006; HARRAZ et al, 2015; ZHU et al, 2018).

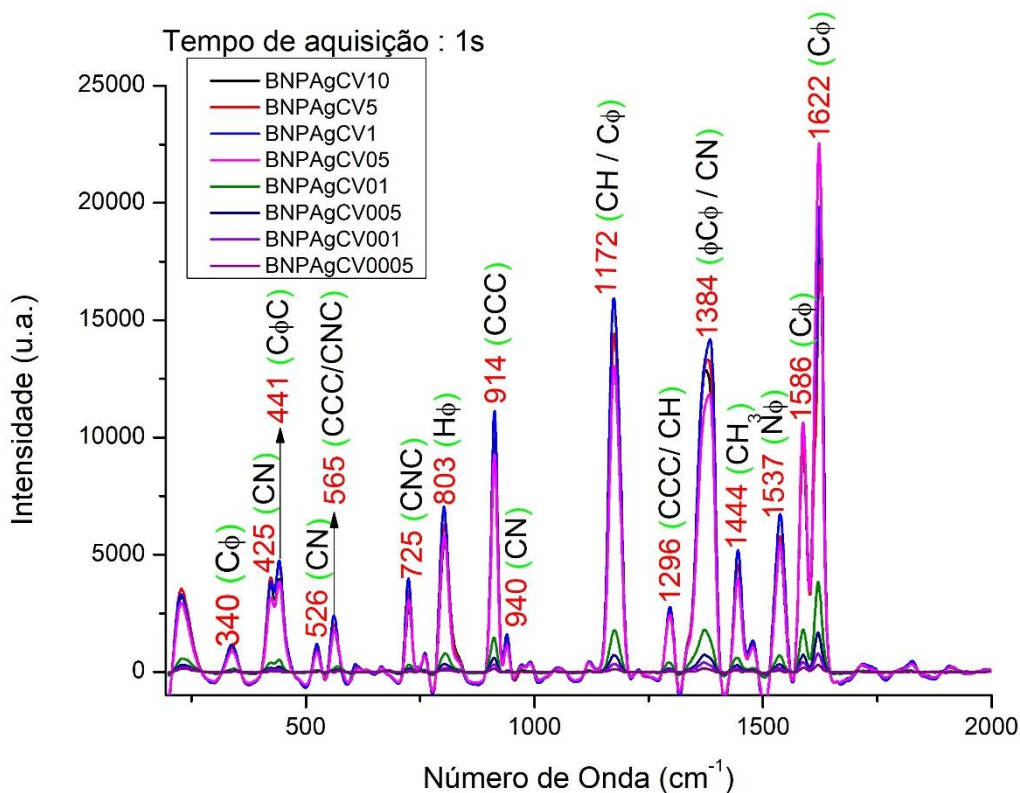
Esse fato pode ser confirmado pelo aparecimento da banda em 941 cm⁻¹ no espectro SERS do CV, que corresponde ao estiramento da ligação C-N e o deslocamento e intensificação da banda em 1380 cm⁻¹ do estiramento assimétrico da ligação C-N, que corresponde no Raman normal à banda em 1372 cm⁻¹, e ainda o

aparecimento da banda 423 cm^{-1} de estiramento de flexão da ligação C-N-C (Figura 30).

O substrato proposto é, ainda, passível de ser utilizado para quantificação do cristal violeta, visto que os espectros apontam uma intensificação proporcional das bandas para as concentrações analisadas. Assim, é possível caracterizar, identificar e possivelmente estimar quantitativamente a presença de CV em concentrações baixas, até um mínimo de 50 nmol.L^{-1} em solução de colóide de prata.

Quando as soluções de diferentes concentrações de CV foram depositadas nos substratos BNPAg (botriosferana coberta com NPAg), foram obtidos os espectros apresentados na Figura 32.

Figura 32 – Espectros SERS do CV em diferentes quantidades de massa sobre o substrato BNPAg ($\lambda = 532\text{ nm}$ / $t = 1\text{ s}$)



Fonte: autoral

- Onde, BNPAgCV10 = substrato de botriosferana com NPAg e $10,0\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de CV; BNPAgCV5 = substrato de botriosferana com NPAg e $5,0\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de CV; BNPAgCV1 = substrato de botriosferana com NPAg e $1,0\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de CV; BNPAgCV05 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,5\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de CV; BNPAgCV01 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,1\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de CV; BNPAgCV005 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,05\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de CV; BNPAgCV001 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,01\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de CV; BNPAgCV0005 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,005\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de CV.

= substrato de botriosferana com NPAg e $1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CV;BNPAgCV10 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CV;BNPAgCV10 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CV;BNPAgCV10 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CV;BNPAgCV10 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CV;BNPAgCV10 = substrato de botriosferana com NPAg e $0,005 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CV.

As amostras depositadas no substrato recobriram uma área de $0,25 \text{ cm}^2$. A faixa de concentrações das soluções de CV analisadas no colóide de NPAg, referentes à Figura 30, que foram depositadas no substrato BNPAg variou de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à 5 nmol.L^{-1} . Nessa faixa, uma proporcionalidade na relação concentração/intensidade foi observada no experimento anterior, que analisou CV no coloide de prata, sendo que a última concentração analisada levou a detecção de cristal violeta no BNPAg em quantidades muito menores, que não foram alcançadas no experimento anterior.

Após a secagem das amostras, as mesmas massas de CV existentes nas amostras do experimento anterior (em SNPAg) encontravam-se igualmente depositadas nos substratos (BNPAg). Para definir a quantidade de massa de CV por área de substrato, a massa correspondente à concentração da solução depositada foi dividida pela área correspondente ao substrato.

Os valores das concentrações convertidos em massa de CV presente em cada substrato de BNPAg são apresentados na Tabela 5. As amostras são denominadas na Figura 32 pela quantidade de massa de cristal violeta contida em 1 cm^2 dos substratos de BNPAg.

Tabela 5 – Massas de Cristal Violeta depositadas nos substratos BNPAg.

Amostras	Concentração da Solução	Massa de CV depositada (μg)	Massa de CV por área de BNPAg ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
BNPAg10	10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	2,652	10
BNPAg5	5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1,326	5
BNPAg1	1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,265	1
BNPAg05	500 nmol.L^{-1}	0,133	0,5
BNPAg01	100 nmol.L^{-1}	0,027	0,1
BNPAg005	50 nmol.L^{-1}	0,013	0,05
BNPAg001	10 nmol.L^{-1}	0,003	0,01
BNPAg0005	5 nmol.L^{-1}	0,001	0,005

Legenda: volume da solução depositada= 650 μL ; MM = 408 g/mol ; área de BNPAg = 0,25 cm^2

Das amostras analisadas nos substratos de BNPAg foi possível detectar com clareza os sinais do cristal violeta até a concentração mínima de 5 nmol.L^{-1} , com massa total correspondente à 0,001 μg de CV. Nesta concentração, a detecção não foi possível no experimento anterior, em solução do colóide de NPAg, que teve um limite na detecção da concentração mínima em 50 nmol.L^{-1} .

A grande diferença, que contribui para a maior sensibilidade do substrato BNPAg, parece ser a forma de deposição do analito sobre o substrato por evaporação do solvente (*casting*). Este procedimento pré-concentra o CV, permitindo uma interação homogênea e mais efetiva das moléculas com a superfície da nanopartícula, visto que estão imobilizadas sobre o biopolímero que consegue aprisionar o material em sua matriz, depois da secagem.

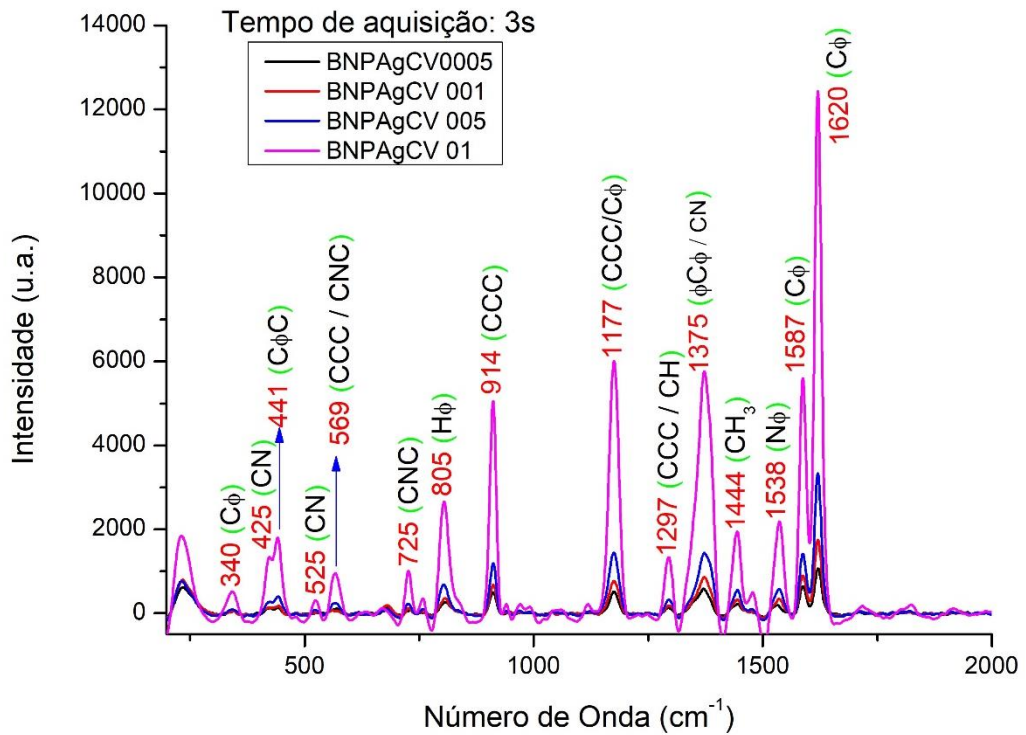
A intensidade dos sinais diminui de forma proporcional com a decrescente quantidade de massa de CV no substrato a partir de 1 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Devido à saturação da superfície do substrato nas massas de 2,6 μg e 1,3 μg de CV, as condições utilizadas começam a interferir de forma negativa na proporcionalidade da intensificação. Não se observa um decaimento proporcional da intensidade para essas massas quando comparado com a variação das massas de 0,265 μg à 0,001 μg , onde os espectros foram obtidos em tempo de aquisição de 1 s, condição que tornou possível a obtenção de espectros de todas as concentrações analisadas.

Com esse resultado, pode-se dizer que existe um limite de massa que permite tornar a técnica quantitativa, o que mesmo assim é um ponto positivo para o substrato com o biopolímero, visto que concentrações menores puderam ser favoravelmente detectadas se comparadas ao limite de detecção da solução coloidal.

Nos substratos de BNPAg, assim como na solução coloidal, é observada a contribuição do mecanismo de troca de carga, devido à intensificação e deslocamento das bandas em 425 cm^{-1} , 941 cm^{-1} e 1384 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento de flexão, estiramento assimétrico e estiramento simétrico da ligação C-N. Isto resulta da interação das moléculas do CV por meio dos pares de elétrons dos átomos de nitrogênio que interagem com as nanopartículas de prata (CAÑAMARES et al, 2008; LIU et al, 2009; CHADHA et al, 2013; MENG et al, 2013; SENAPATI et al, 2014; HARRAZ et al, 2015).

Um estudo da melhor condição para obtenção de espectros SERS de CV sobre o substrato de BNPAg foi realizado no tempo de aquisição igual a 3 s, onde apenas quatro amostras de CV produziram espectros: BNPAgCV01 ($0,11\text{ }\mu\text{g/cm}^2$), BNPAgCV005 ($0,05\text{ }\mu\text{g/cm}^2$), BNPAgCV001 ($0,011\text{ }\mu\text{g/cm}^2$), BNPAgCV0005 ($0,005\text{ }\mu\text{g/cm}^2$). A intensificação dos sinais obtida nesta condição (Figura 33) pode ser comparada com aquela obtida nos experimentos sob tempo de aquisição de 1 s (Figura 34).

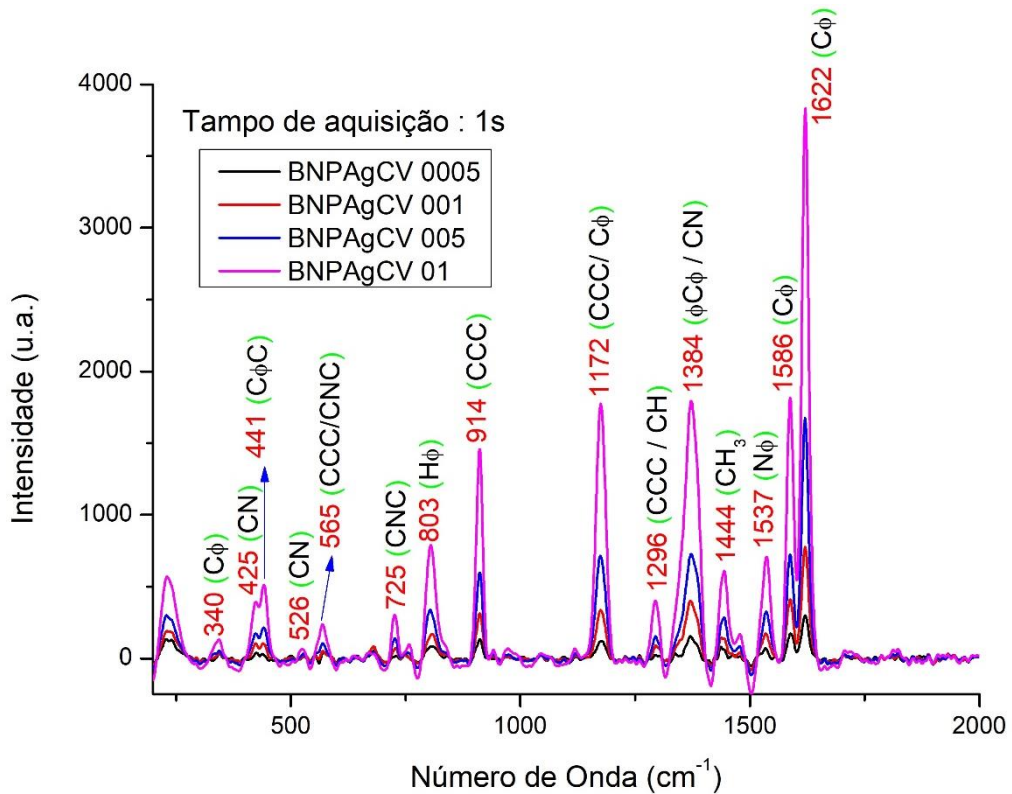
Figura 33 – Espectros SERS do CV no BNPAg ($\lambda = 532 \text{ nm}$ / $t = 3 \text{ s}$)



Fonte: autoral

A Figura 33 mostra os espectros obtidos sob 3 s de aquisição, cujas intensificações são cerca de três vezes a magnitude de intensificação alcançada no espectro obtido para o CV na Figura 34, onde o tempo de aquisição utilizado foi de 1 s, inclusive nos substratos que comportam a menor relação de massa/área, o que torna a aquisição de 3 s melhor para a excitação do plasmon na superfície do substrato. Na Figura 34 a condição usada para obtenção dos espectros SERS com tempo de aquisição de 1 s desfavoreceu a detecção de todos os substratos analisados, devido à menor intensidade das bandas obtidas, principalmente nos substratos em que a massa de CV é menor.

Figura 34 – Espectro SERS do CV sobre BNPAg ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 1 \text{ s}$)



Fonte: autoral

A concentração do analito nesses casos influencia bastante na melhor condição de aquisição de espectros. O tempo de aquisição maior para concentrações menores permite que a radiação espalhada sobre a amostra se distribua de forma mais homogênea, captando melhor as vibrações da molécula, visto que as mesmas se encontram mais dispersas na superfície do substrato. Além disso, em concentrações menores, ocorre uma adsorção aleatória da molécula sonda nessa superfície.

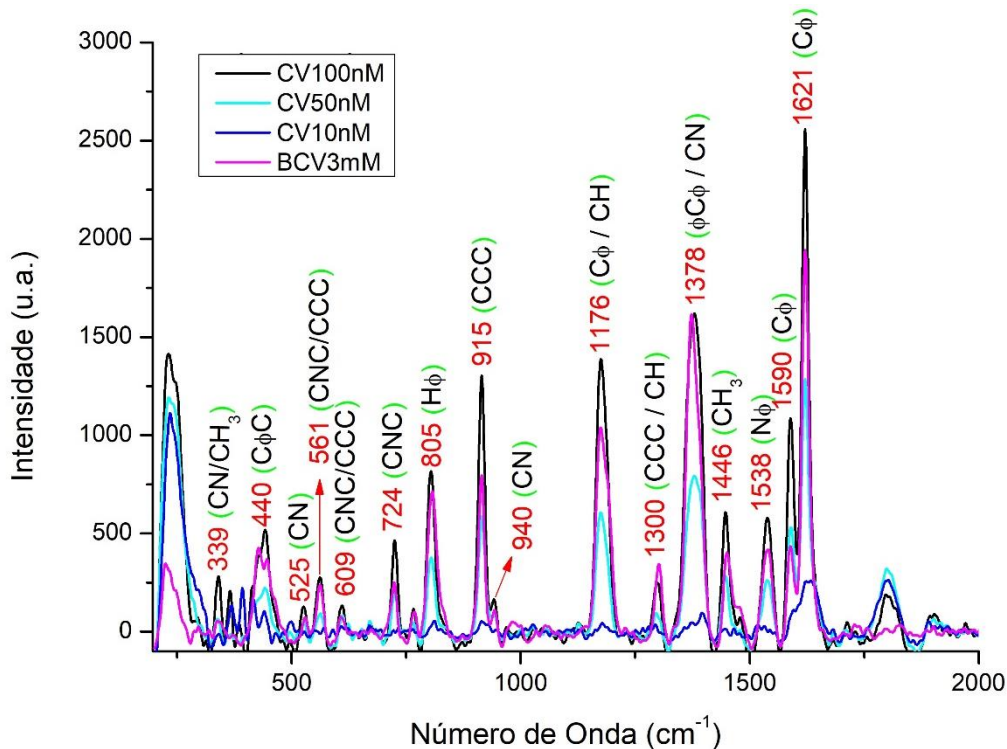
Esses dados nos levam à importância de se estabelecer um padrão nas condições de análise de determinadas concentrações, a fim de conseguir gerar dados espectrais que favoreçam a maior intensificação possível do sinal para o substrato proposto.

Não foi possível obter espectros das amostras com relação massa/área maiores que $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ na condição de 3 s no BNPAg, devido à saturação da radiação espalhada.

Uma análise das amostras de CV (entre 100 e 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) em

solução de NPAg foi realizada no tempo de aquisição de 3 s e os resultados foram comparados com as amostras de mesma massa no substrato BNPAg com o cristal violeta (BNPAg01, BNPAg005, BNPAg001) da Figura 33. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 35.

Figura 35 – Espectros SERS do CV em coloide de NPAg ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$)



Fonte: autoral

- Onde, CV 100 nM = Solução de CV em NPAg 100 nmol.L⁻¹; CV 50 nM = Solução de CV em NPAg 50 nmol.L⁻¹; CV 10 nM = Solução de CV em NPAg 10 nmol.L⁻¹; BCV 3 mM = Solução de CV (branco) 3 mmol.L⁻¹.

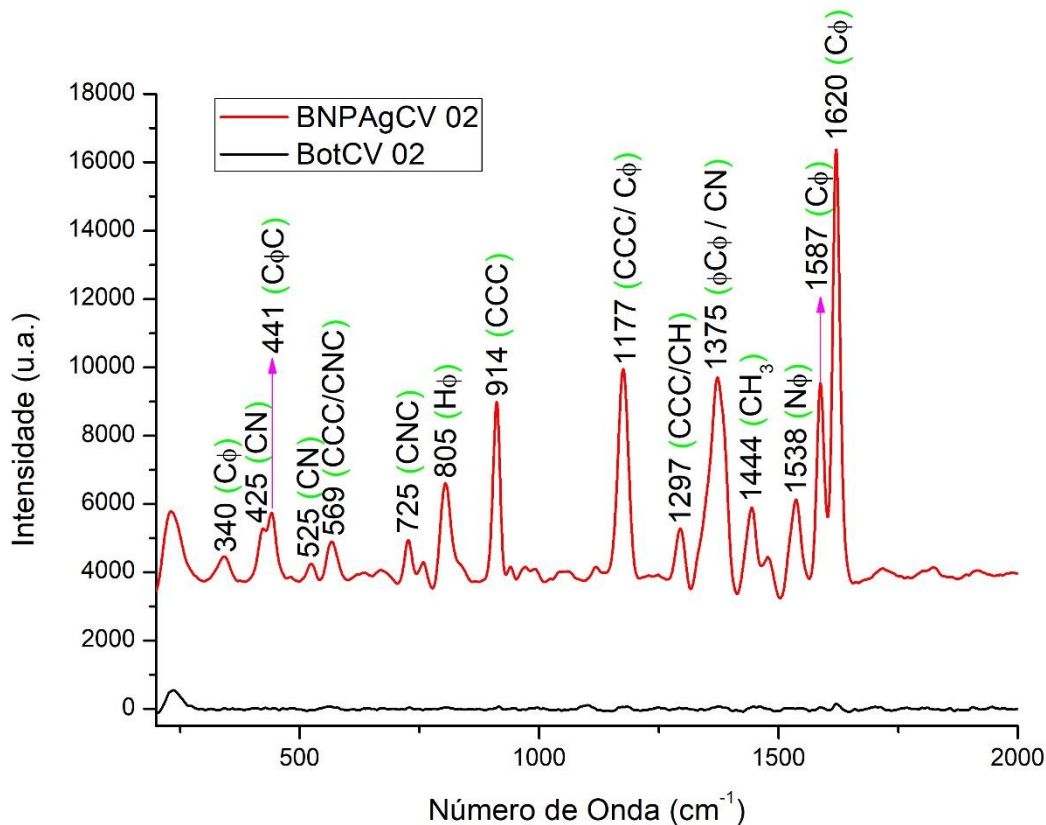
Por comparação a contribuição do substrato de BNPAg para o aprimoramento do sinal do CV fica evidente, sob aquisição de 3 s. As bandas do CV apresentam intensidades no substrato de BNPAg que chegam a alcançar mais de 12000 espalhamentos por área de substrato. A intensidade é muito menor quando o CV é analisado no coloide de prata, perdendo até 10 vezes a sua magnitude.

Considerando que a mesma quantidade de moléculas está envolvida nos dois sistemas e que os espectros são obtidos no mesmo tempo de aquisição, a

maior intensidade de sinais no substrato provavelmente se deve à concentração da massa do CV em uma região do substrato capaz de adsorvê-lo de modo a apresentar uma maior interação analito/substrato. A análise de CV no substrato de BNPAg é favorecida com um espalhamento mais homogêneo, por apresentar uma superfície onde a molécula pode ser imobilizada e a luz pode promover uma varredura mais efetiva do material, ganhando-se em resolução e intensidade dos espectros.

Outra forma interessante de se comprovar a importância da superfície nanoestruturada na detecção e identificação do CV se dá pela análise do espectro obtido com uma massa de 0,027 μg de CV sobre o filme de botriosferana desprovido de nanopartículas de prata (BotCV 02) (Figura 36). Nesta, observa-se a comparação com o espectro da amostra contendo a mesma massa de CV, no substrato de BNPAg.

Figura 36 – Espectros do CV em filme de botriosferana (BotCV 02) e no substrato BNPAg (BNPAgCV 02). ($m_{\text{CV}} = 0,027 \mu\text{g}$) ($\lambda = 532 \text{ nm}$ / $t = 3 \text{ s}$)



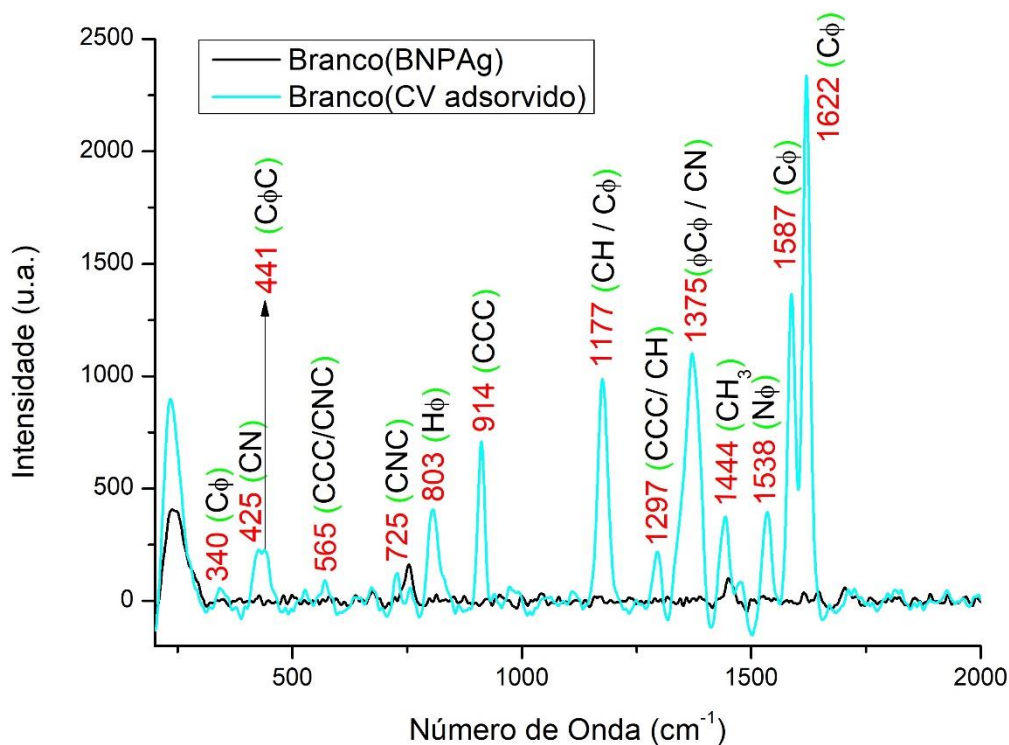
Fonte: autoral

É possível identificar a alta intensidade do espectro do CV quando

sobre uma superfície metálica nanoestruturada. A contribuição do campo eletromagnético promovido pelas NPAg se revela fundamental para a identificação do cristal violeta quando minúsculas quantidades de massa são depositadas sobre o substrato.

Adicionalmente em outro experimento, um branco do substrato de BNPAg que não continha qualquer amostra do CV foi analisado por espectroscopia Raman (Figura 37, linha de cor preta). Depois de analisado, ele foi colocado em estufa à 65 °C por 5 horas, na presença de outros substratos de BNPAg que continham o analito CV e que estavam úmidos. Quando novamente analisada, esta amostra do branco surpreendentemente apresentou um espectro SERS com bandas características do CV, evidenciando a sensibilidade do substrato para traços do analito que possa ter sublimado no momento da evaporação da água na secagem das outras lâminas de substrato.

Figura 37 – Espectros SERS do branco BNPAg antes (BNPAg) e após incubação em estufa com outros substratos contendo CV (CV adsorvido). ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$)



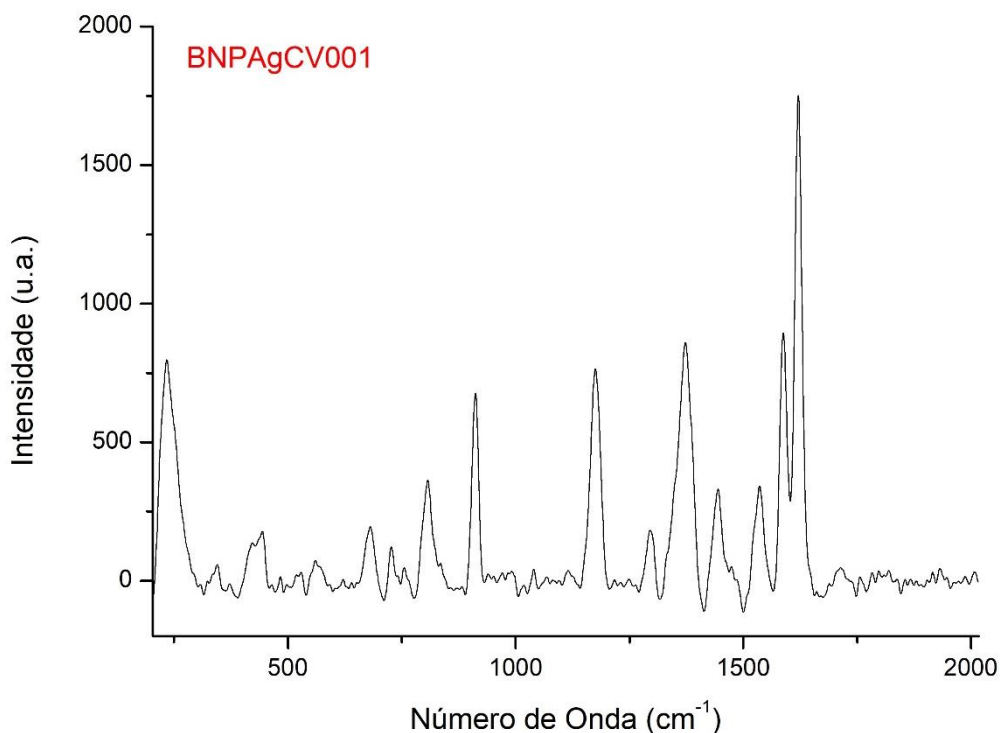
Fonte: autoral

O espectro Raman deste substrato, agora contendo CV, pode ser

comparado em relação à sua intensidade ao espectro de CV na Figura 38, onde a quantidade de cristal violeta no BNPAg é conhecida e equivale à $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dessa análise pode-se fazer uma estimativa da concentração do CV por área do substrato presente na amostra que foi submetida a incubação na estufa com as amostras úmidas de CV. Uma massa um pouco maior que $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pode ter sido adsorvida na superfície do BNPAg durante as 5 h de experimento, levando em consideração os resultados das intensidades obtidas no espectro SERS dessa amostra para o cristal violeta.

Essa comparação pôde ser realizada devido à proporcionalidade encontrada nos resultados dos experimentos anteriores, que estabeleceram uma relação direta entre a intensidade e a concentração de CV em cada substrato analisado, que diminui à medida que a massa da amostra no substrato foi reduzida, para as mesmas condições de análise.

Figura 38 – Espectro SERS do cristal violeta à $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. ($\lambda = 532 \text{ nm}$ / $t = 3 \text{ s}$)

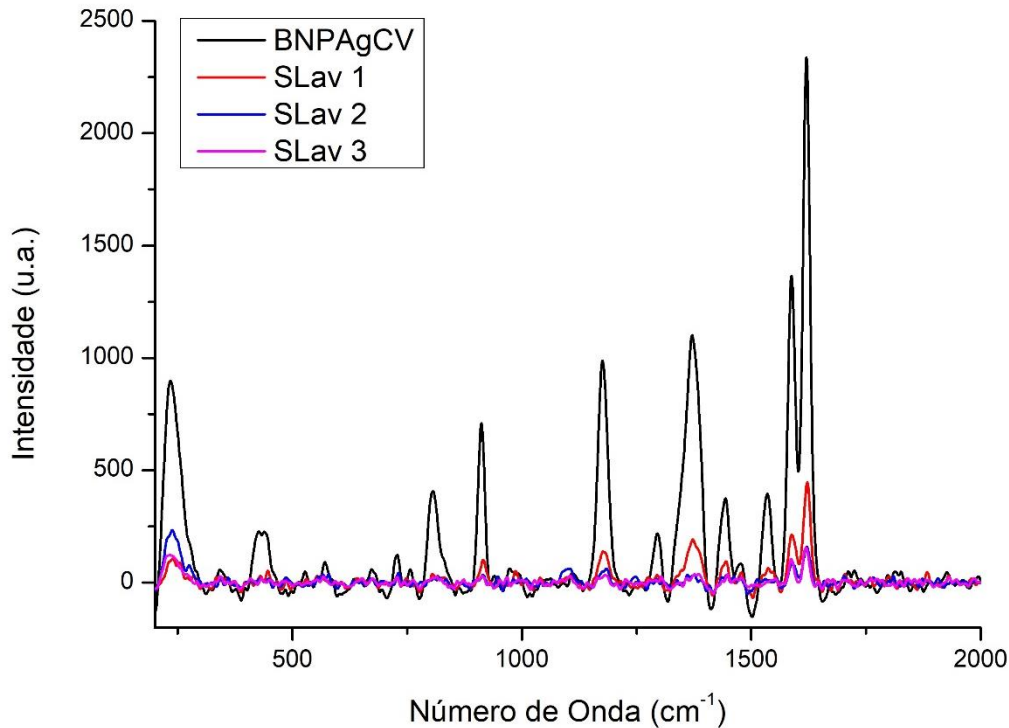


Fonte: autoral

Essa mesma amostra de BNPAg (branco), que foi submetida à incubação na estufa com as amostras úmidas contendo CV, foi lavada para se

investigar se haveria a possibilidade de retirar o analito da superfície, depois de adsorvido, e avaliar a possibilidade de reutilização do substrato. Os espectros obtidos encontram-se na Figura 39.

Figura 39 – Espectros SERS de CV no substrato BNPAg lavado em 3 etapas de 20 lavagens a cada 10s ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$)



Fonte: autoral

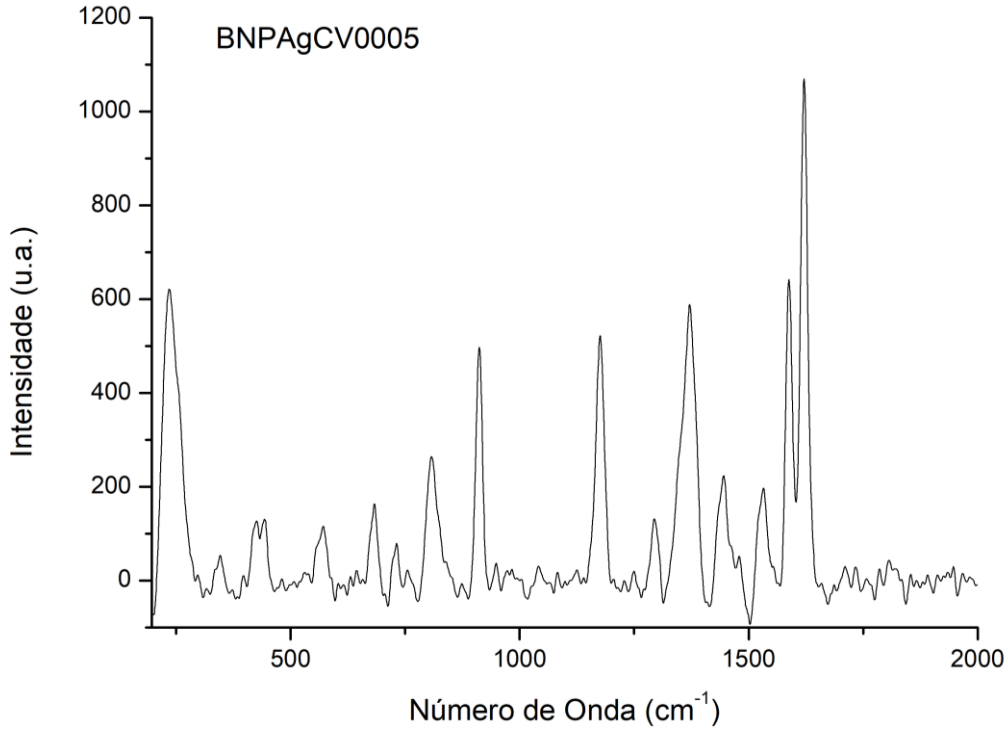
- Onde, BNPAgCV = substrato depois de submetido a incubação na estufa com as amostras úmidas de CV; SLav 1 = BNPAgCV após a primeira lavagem; SLav 2 = BNPAgCV após a segunda lavagem; SLav 3 = BNPAgCV após a terceira lavagem.

Essa análise aponta a diminuição da intensidade dos sinais nos espectros do CV à medida que mais etapas de lavagens foram realizadas, o que nos leva a inferir que é possível retirar praticamente todo o analito da superfície do substrato aumentando-se o número de ciclos de lavagens. Este fato caracteriza a possibilidade de reutilização do substrato, sugerindo que o material pode ter viabilidade comercial em perspectivas futuras.

É possível ainda estimar a quantidade de analito remanescente no

substrato, comparando as intensidades do espectro das amostras após a lavagem (Figura 39) com a intensidade do espectro na Figura 40, que tem sua concentração definida por área de substrato como sendo $0,005 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

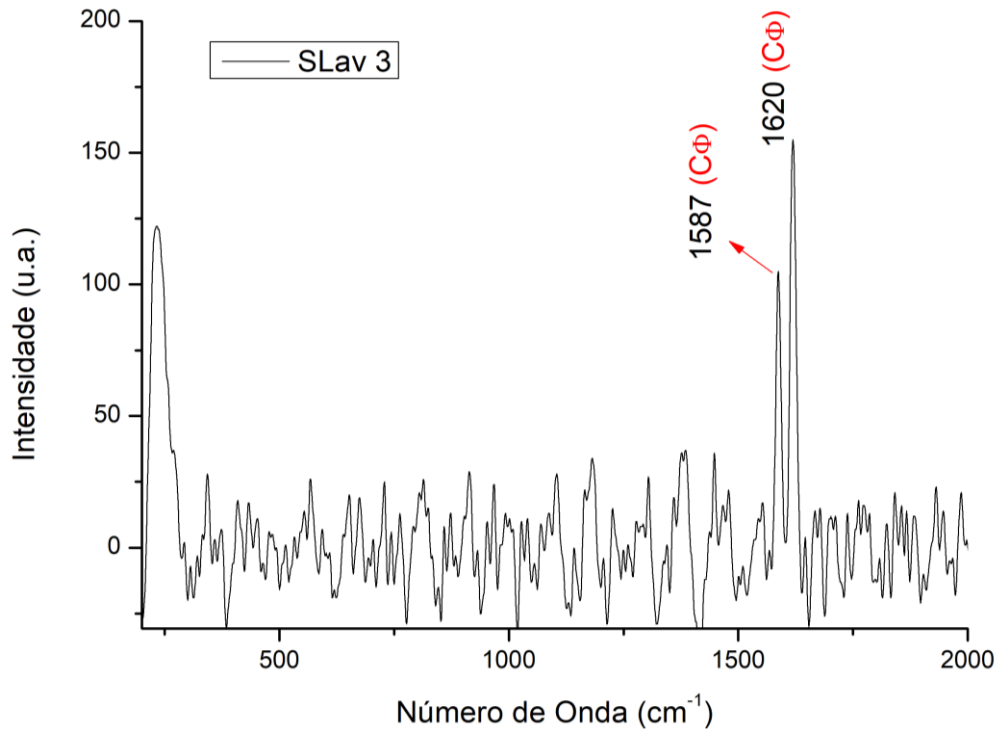
Figura 40 – Espectro SERS do cristal violeta à $0,005 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. ($\lambda = 532 \text{ nm} / t = 3 \text{ s}$)



Fonte: autoral

É possível estimar a partir das intensidades do espectro da Figura 40, que uma detecção de menos de $0,005 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ foi obtida após os ciclos de lavagem (Figura 39), levando à conclusão de que concentrações muito menores que 5 nmol.L^{-1} são passíveis de detecção no substrato preparado a base do biopolímero botriosferana revestido com NPAg. As intensidades alcançadas nesse substrato para a quantidade de cristal violeta depositada após a lavagem, foram reduzidas cerca de 16 vezes a intensidade inicial, a última amostra analisada corresponde ao último ciclo de lavagem (SLav3) e é mostrada na Figura 41.

Figura 41 – Espectro SERS do cristal violeta após o 3º ciclo de lavagem (SLav 3).

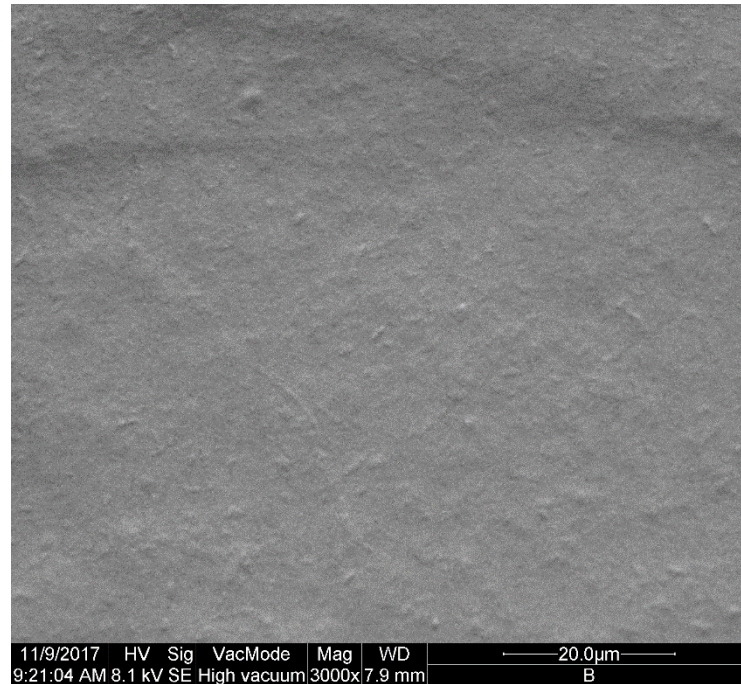


Fonte: autoral

Outra evidência que é possível retirar desses resultados é a forma como o analito está adsorvido na superfície do substrato. Sugere-se nesse caso uma adsorção física, visto que o analito é solúvel em água e a lavagem delicada da superfície com água destilada resultou na redução da intensidade das bandas do espectro SERS do CV à medida que ele passa por novos ciclos de lavagens.

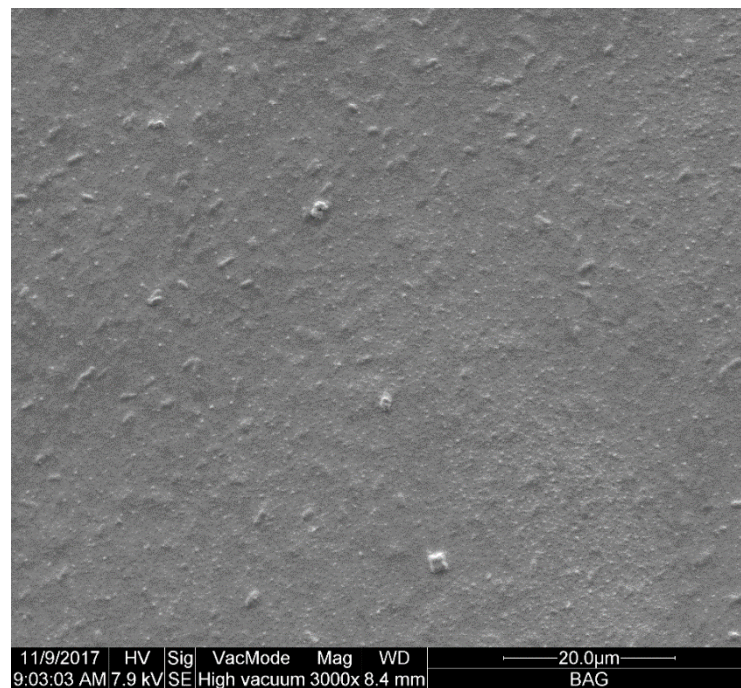
Para investigar algumas propriedades essenciais da superfície do substrato que contribuíram para a obtenção desses resultados e a manifestação do efeito SERS para as moléculas de cristal violeta e cisteína, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi essencial, e permitiu a caracterização da morfologia na superfície do substrato BNPAg. Nas figuras 42 e 43 pode-se observar as imagens obtidas.

Figura 42 – Imagens da MEV do filme de botriosferana



Fonte: autoral

Figura 43 – Imagem da MEV do substrato BNPAg.



Fonte: autoral

Na Figura 42 é possível observar uma rugosidade sutil na superfície do filme de botriosferana que corrobora com os resultados de superfície obtidos do filme de botriosferana por AFM (Figura 17). Observa-se ainda uma homogeneidade da cobertura da superfície da lâmina de vidro com o material biopolimérico, o que garante ao substrato proposto propriedades físico-químicas importantes para promover um bom espalhamento da luz na aplicação em SERS. Na Figura 43 a cobertura das nanopartículas também apresenta homogeneidade e formação de alguns aglomerados aleatórios de NPAg, características que permitem a formação de *hot-spots* e a intensificação do campo eletromagnético que contribui com o efeito SERS.

Os fatores de intensificação (EF) para o substrato de BNPAg foram calculados para todos os espectros obtidos de acordo com a Equação 2 (página 50), comparando a integral da intensidade (I_{bulk} e I_{SERS}) da banda de referência em 1622 cm^{-1} nos espectros obtidos das amostras em solução com os espectros obtidos de suas respectivas massas no substrato SERS (botriosferana coberta com NPAg). Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Fator de Intensificação para o Cristal Violeta no substrato BNPAg.

Concentração	I_{SERS}	I_{Bulk}	N_{SERS}	N_{Bulk}	EF
10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	420745	34600	3×10^{12}	$6,05 \times 10^{16}$	$2,5 \times 10^5$
5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	409569	22364	$1,6 \times 10^{12}$	3×10^{16}	$3,4 \times 10^5$
1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	471346	6396	$3,3 \times 10^{11}$	6×10^{15}	$1,3 \times 10^6$
500 nmol.L^{-1}	480492	5286	$1,4 \times 10^{11}$	3×10^{15}	$1,9 \times 10^6$
100 nmol.L^{-1}	240168	2350	3×10^{10}	6×10^{14}	$2,0 \times 10^6$
50 nmol.L^{-1}	63111	940	$1,4 \times 10^{10}$	3×10^{14}	$1,4 \times 10^6$
10 nmol.L^{-1}	35016	982	3×10^9	6×10^{13}	$7,1 \times 10^5$
5 nmol.L^{-1}	21079	702	$1,4 \times 10^9$	3×10^{13}	$6,4 \times 10^5$

Os valores obtidos para o N_{SERS} e o N_{BULK} levaram em consideração o diâmetro do laser, a ordem de grandeza da potência do laser incidida nas amostras, as concentrações no caso das amostras em solução (sem presença de NPAg) e as massas por área de substrato para o cristal violeta depositado no filme de botriosferana com NPAg.

Os dados da Tabela 6 mostram os fatores de intensificação SERS para o substrato proposto, estes não apresentam uma ordem de crescimento linear. O que se pode inferir é que possivelmente a molécula analito CV não tenha sido adsorvida com um direcionamento ideal na superfície da NPAg (moléculas adsorvidas na posição vertical apresentam melhores aprimoramentos de sinal). Normalmente, existe um aumento do EF a medida que a concentração do analito diminui, pois verifica-se uma maior aproximação dessas moléculas da superfície nanoestruturada em uma única camada, livre da blindagem de outras camadas de analito mais afastadas dessa superfície, que acabam prejudicando os efeitos de intensificação devido às maiores distâncias da camada de NPAg.

Outro fator que infere-se resultar nessa heterogeneidade nos valores obtidos é a topologia do substrato, que é irregular, apresentando espessuras e rugosidade diferentes, como mostrado no AFM.

Os fatores de intensificação calculados para o substrato compreendem uma ordem de grandeza de 10^5 a 10^6 vezes, comparados com o sinal apresentado para o Raman normal das soluções de cristal violeta nas diferentes concentrações em que foi obtido.

A partir desses valores calculados pode-se perceber que a sensibilidade do substrato se mantém em uma ordem de grandeza quase constante alcançando uma detecção de cristal violeta no substrato de até 12 pmol/cm^2 (quantidade de analito que contribui efetivamente para o sinal). Os resultados obtidos apresentaram uma ordem de grandeza em acordo com a literatura, onde o fator de intensificação varia de 10^3 a 10^7 ordens de grandeza (SKOOG et al, 2007; FAN et al, 2011).

É importante deixar claro que os valores obtidos para o EF nesse trabalho são aproximados e deve-se considerar que vários fatores podem estar influenciando nesses valores, como a interação molécula/substrato, a polarizabilidade das ligações e a forma das nanopartículas. Deve-se lembrar ainda que os resultados

da MEV mostraram uma distribuição aleatória dos aglomerados, onde possivelmente se concentram os *hot-spots* que intensificam esse efeito. Cumpre-se assim o objetivo principal do trabalho: utilizar um substrato orgânico como suporte de nanopartículas metálicas que venha a servir como substrato SERS eficiente na detecção e caracterização de uma molécula orgânica.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na análise das substâncias orgânicas deste trabalho por espectroscopia Raman, nas soluções coloidais de NPAg e NPAu e nos substratos de BNPAu e BNPAg, foram satisfatórios, no sentido de detectar e caracterizar as moléculas sonda analisadas (cisteína e cristal violeta).

As amostras analisadas com NPAg em solução e no substrato com o biopolímero (BNPAg) apresentaram resultados mais satisfatórios que os alcançados com as NPAu, isso devido à desestabilização das NPAu após o contato com o analito investigado (cisteína). Os resultados para as NPAg foram reproduzíveis para as duas moléculas sonda analisadas, perdendo sensibilidade para concentrações menores da molécula de cisteína, quando analisada na superfície do substrato BNPAg. Isto possivelmente se deve à instabilidade da interação sonda/substrato.

Os espectros Raman obtidos sugerem a possibilidade de quantificação da cisteína e do cristal violeta na solução coloidal de NPAg em baixas concentrações, devido à proporcionalidade encontrada na relação intensidade/concentração nas duas amostras.

Apenas o CV foi passível de detecção no substrato BNPAg até uma concentração de 5 nmol.L^{-1} , que corresponde a $0,001 \text{ } \mu\text{g}$ de CV depositados na superfície, muito menor que o limite alcançado em solução de NPAg (50 nmol.L^{-1}). O mesmo resultado não foi observado para a molécula de cisteína no substrato BNPAg, que apresentou resposta para apenas uma amostra no BNPAg com massa igual a 48 mg/cm^2 e com $\text{EF} = 48$, muito abaixo dos evidenciados na literatura, destacando a baixa eficiência desse substrato na detecção desse analito.

Os resultados promissores para o cristal violeta foram possíveis devido a melhor interação dessa molécula com as NP na superfície do substrato e a capacidade do substrato de adsorver o analito de forma satisfatória, devido às propriedades citadas do biopolímero utilizado, da rugosidade presente na sua superfície, evidenciada pela MEV e AFM, e da homogeneidade que as nanopartículas apresentaram na deposição sobre o biopolímero, permitindo melhor interação da radiação com a superfície, além da contribuição da técnica de deposição na formação de alguns *hot-spots*, mesmo que aleatórios.

Sugere-se que o substrato seja passível de reutilização, visto que

pode-se retirar o analito utilizando apenas lavagem com água, desde que o analito seja solúvel em água. Descreve-se uma preparação limpa, que não utiliza solventes orgânicos de qualquer natureza e uma satisfatória obtenção dos colóides de NPAg e NPAu pela técnica de ablação a laser, como foi apresentado pelas análises de UV-vis dos colóides sintetizados.

Os métodos utilizados para a confecção do substrato são facilmente manipuláveis. Utiliza-se um biopolímero como suporte, biodegradável e de fonte renovável. Sugere-se que o substrato desenvolvido por este trabalho seja um material promissor para a aplicação no monitoramento de fármacos e detecção de moléculas biológicas, por possuir baixo custo e produzir um fator de intensificação SERS que chega a 10^6 ordens de grandeza para análises de amostras contendo cristal violeta, detectando uma quantidade de matéria correspondente a 12 pmol.L^{-1} . Estes são resultados notavelmente satisfatórios e em acordo com os aprimoramentos SERS encontrados na literatura para a molécula de cristal violeta (CV).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, H. B. ZAHRAN, M.K. EMAM, H. E. Heatless synthesis of well dispersible Au nanoparticles using pectin Biopolymer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 208–219, 2016.

ÁLVAREZ-PUEBLA, R. A. E LIZ-MARZÁN, L. M. Traps and cages for universal SERS detection. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 43-51, 2012.

BAI, Y. YANA, L. WANG, J. SUA, L. CHENA, N. TAN, Z. Highly reproducible and uniform SERS substrates based on Ag nanoparticles with optimized size and gap. *Photonics and Nanostructures – Fundamentals and Applications*, v.23, p.58–63, 2017.

BAO, H. WANG, Y. ZHANG, H. ZHAO, Q. LIU, G. CAI, W. Ultrathin tin oxide layer-wrapped gold nanoparticles induced by laser ablation in solutions and their enhanced performances. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 489, p. 92–99, 2017.

BARBOSA, A. M. STELUTI, R. M. ROBERT F.H. DEKKER, R. F.H. CARDOSO, M. S. CORRADI DA SILVA, M.L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1-3;1-6)- β -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1691-1698, 2003.

BAYÓN, B. BUCALÁ, V. CASTRO, G. R. Development of antimicrobial hybrid mesoporous silver phosphate-pectin microspheres for control release of levofloxacin. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 226, p. 71-78, 2016.

BHUI, D. K. BAR, H. SARKAR, P. SAHOO, G. P. DE, S. P. MISRA, A. Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. **Journal of Molecular Liquids**, p. 145, p. 33–37, 2009.

BONGIOVANI, R. A. M. Características Realógicas do Exopolissacarídeo Botriosferana Produzido Pelo *Botryosphaeria Rhodina* MAMB-05 em três Fontes de Carbono: glucose, frutose e sacarose. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP, 2008.

BONIFÁCIO, A. MARTA, S. D. SPIZZO, R. CERVO, S. STEFFAN, A. COLOMBATTI, A. SERGO, V. Surface enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study. **Anal Bioanal Chem.**, v. 406, p. 2355-2365, 2014.

BUWALDA, S. J. BOERE, K.W.M. DIJKSTRA, P. J. FEIJEN, J. VERMONDEN, T. HENNINK, W. E. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 254–273, 2014.

BYRAM, C. MORAM, S. S. B. SHAIK, A. K. SOMA, V. R. Versatile gold based SERS substrates fabricated by ultrafast laser ablation for sensing picric acid and ammonium nitrate. **Chemical Physics Letters**, v. 685, p.103–107, 2017.

CAMPION, A. & KAMBHAMPATI, P. Surface-enhanced Raman scattering. **Chemical Society Reviews**, v. 27, p. 241 – 250, 1998.

CAÑAMARES, M. V. CHENAL, C. BIRKE, R. L. LOMBARDI, J. R. DFT, SERS, and Single-Molecule SERS of Crystal Violet. **Journal Physical Chemistry C**, v.112, p. 20295–20300, 2008.

CHADHA, R. MAITI, N. KAPOOR, S. Triplet and SERS study of crystal violet in presence of metal Nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, v. 579, p. 68–72, 2013.

CHAN, C. Y. LI, J. ONG, C. XU, J. B. WAYE, M. M. Y. Angle-Resolved Surface-Enhanced Raman Scattering. **Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization**. Editora Challa S. S. R. Kumar , 2012.

CHEN, J-W. LEI, Y. LIU, X-J. JIANG, J-H .SHEN, G-L. YU, R-Q. Immunoassay using surface-enhanced Raman scattering based on aggregation of reporter-labeled immunogold nanoparticles. **Anal Bioanal Chem**, v.392, p.187–193, 2008.

CHEN, K-J. LU, C-J. A vapor sensor array using multiple localized surface plasmon resonance bands in a single UV–vis spectrum. **Talanta**, v. 81, p.1670–1675, 2010.

CHEN, R. LIN, J. FENG, S. HUANG, Z. CHEN, G. WANG, J. LI, Y. ZENG, H. Applications of SERS spectroscopy for Blood Analysis. **Applications of Raman Spectroscopy to Biology**, p. 73-103, 2012.

CHIDAMBARAM, S. KUMAR, G. M. ILANCHEZHIAN , P. MAHESWARAN, R. KANG, T.W. Self-functionalization of L-Cysteine on Ag nanoparticle decorated SiO₂ nanospheres. **Materials Letters**, v. 191, p.165–168, 2017.

CHOU, S. G. PLENTZ, F. JIANG, J. SAITO, R. NEZICH, D. RIBEIRO, H. B. JORIO, A. PIMENTA, M. A. SAMSONIDZE, GE. G. SANTOS, A. P. ZHENG, M. ONOA, G. B. SEMKE, E. D. DRESSELHAUS, D. DRESSELHAUS, M. S. Phonon-Assisted Excitonic Recombination Channels Observed in DNA-Wrapped Carbon Nanotubes Using Photoluminescence Spectroscopy. **Physical Review Letters**, v. 94, p. 127402-1 - 127402-4, 2005.

CIALLA, D. MARZ, A. BOHME, R. THEIL, F. WEBER, K. SCHMITT, M. POPP, J. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. **Anal Bioanal Chem.**, v.403, p. 27-54, 2012.

COLTHUP, N. B. DALY, L. H. WIBERLY, S. E. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**. Academic Press Inc. 3^a edição, 1990.

COSTA, J. C. S. Desenvolvimento de Sensores nanoestruturados para análises químicas por meio de técnicas espectroscópicas. **Tese de Doutorado**. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2012.

CULLITY, B. D. **Elements of X-Ray Diffraction**, 2^a Edição, Addison Wesley Inc., New York, NY, USA, 2001.

DE FARIA, D. L. A. AFONSO, M. C. EDWARDS, H. G.M. Espectroscopia Raman: Uma Nova Luz No Estudo De Bens Culturais. **Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia**, v. 12, p. 249-267, 2002.

DE FARIA, D. L. A. SANTOS, L. G. C. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico da luz: Repetindo o experimento de Raman. **Química Nova**, v. 20, 1997.

DE FARIA, D. L. A. TEMPERINI, M. L. A. SALA, O. Vinte anos de efeito SERS. **Química Nova**, v. 22, 1999.

DE OLIVEIRA, V. S. Propriedades ópticas de nanopartículas de vanádio produzidas por ablação a laser. **Dissertação de Mestrado**. Setor de Tecnologia. UFPR, 2013.

DE SANTANA, H. ZAIA, D. A. M. CORIO, P. EL HABER, F. LOUARN, G. Preparação e caracterização de substratos sers ativos: um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. **Quim. Nova**, v. 29, p. 194-199, 2006.

DOURADO, A. H. B. QUEIROZ, R. TEMPERINI, M. L. A. SUMODJO, P. T. A. Investigation of the electrochemical behavior of L-cysteine in acidic media. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 765, p. 87-91, 2016.

DUGANDZIC, V. HIDI, I. J. WEBER, K. CIALLA-MAY, D. POPP, J. In situ hydrazine reduced silver colloid synthesis e Enhancing SERS reproducibility. **Analytical Chimica Acta**, v. 946, p.73-79, 2016.

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

FAN, M. LAI, F-J. CHOU, H-L. LU, W-T. HWANG, B-J. BROLO, A. G. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) from Au:Ag bimetallic nanoparticles: the effect of the molecular probe. **Chemical Science**, v. 4, 509-515, 2013.

FANG, C. ZHANG, M. Nanoparticle-based theragnostics: Integrating diagnostic and therapeutic potentials in nanomedicine. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 2–5, 2010.

FERNANDES, C. R. Espalhamento Raman dependente da temperatura em Cristais de ácido dl-aspártico. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Física. Universidade Federal do Ceará, 2010.

FLEISCHMANN, M. HENDRA, P. J. AND MCQUILLAN, A. J. Raman Spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, p. 163 – 166, 1974.

FRANÇA, E. Produção de Filmes automontados constituídos por polianilina associado ao exopolissacarídeo fúngico Botriosferana. **Dissertação de Mestrado**. Centro de Ciências Exatas – UEL, 2007.

GARRELL, R. Surface-enhanced Raman spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 401-411, 1989.

GAVELÁN, R. N. B. Estudos das propriedades estruturais através de espectroscopia Raman de amostras de grafite de poucas camadas (GPC) obtidas por clivagem mecânica. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, 2012.

GEISE, E. C. DEKKER, R. F. H. BARBOSA, A. M. SILVA, R. Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1→3; 1→6) – β – D – glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB – 05. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 953 – 956, 2008.

GHIUTĂ, I. CRISTEA, D. CROITORU, C. KOST, J. WENKERT, R. VYRIDES, I. ANAGIOTOS, A. MUNTEANU, D. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles, biosynthesized using Bacillus species. **Applied Surface Science**, v. 438, p. 66-73, 2018.

GHOSH, S. K. NATH, S. KUNDU, S. ESUNI, K. PAL, T. Solvent and ligand effects on the localized surface Plasmon Resonance (LSPR) of gold colloids. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, p. 13963 – 13971, 2004.

GÓMEZ-GÓMEZ, M. CALDERÓNA, J. ABARGUESB, R. RODRÍGUEZ-CANTÓB, P. J. SUÁREZA, I. MARTÍNEZ PASTORA , J. P. HIL, D. An advance towards the synthesis of Ag nanorod arrays with controlled surface roughness for SERS substrates. **Materials Today: Proceedings**, v.3, p.294 – 302, 2016.

GOULET, P. J. G. DOS SANTOS, JR., D. S. ALVAREZ-PUEBLA, D. S. OLIVEIRA, JR., O. N. AROCA, R. F. Surface-Enhanced Raman Scattering on Dendrimer/Metallic Nanoparticle Layer-by-Layer Film Substrates. **Langmuir**, v. 21, p.5576-5581, 2005.

GRACIE, K. MOORES, M. SMITH, W. E. HARDING, K. GIROLAMI, M. GRAHAM, D. FAULDS, K. Preferential Attachment of Specific Fluorescent Dyes and Dye Labeled DNA Sequences in a Surface Enhanced Raman Scattering Multiplex. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 1147–1153, 2016.

GRAHAM, D. SMITH, W. E. LINACRE, A. M. T. MUNRO, C. H. WATSON, N. D. WHITE, P. C. Selective Detection of Deoxyribonucleic Acid at Ultralow Concentrations by SERRS. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 4703-4707, 1997.

GRASSESCHI, D. TOMA, E. The SERS effect in coordination chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v.333, p.108–131, 2017.

HAO, E. & SCHATZ, G. C. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. **The Journal of Chemical Physics**, v. 120, p. 357 – 366, 2004.

HAO, J. HAN, M-J. HAN, S. MENG, X. SU, T-L. WANG, Q. K. SERS detection of arsenic in water: A review. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 152 – 162, 2015.

HARPER, M. M. MCKEATINGW, K. S. FAULDS, K. Recent developments and future directions in SERS for bioanalysis. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.15, p. 5312-5328, 2013.

HARRAZ, F. A. ISMAILA, A. A. BOUZIDA, H. AL-SAYARIA, S.A. AL-HAJRYA, A. AL-ASSIRI, M.S. Surface-enhanced Raman scattering (SERS)-active substrates from silver plated-porous silicon for detection of crystal violet. **Applied Surface Science**, v. 331, p. 241–247, 2015.

HE, L. RIASSETTO, D. BOUVIER, P. RAPENNE, L. CHAIX-PLUCHERY, O. STAMBOULI, V. LANGLET, M. Controlled growth of silver nanoparticles through a chemically assisted photocatalytic reduction process for SERS substrate applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.277, p.1–11, 2014.

HERING, K. CIALLA, D. ACKERMANN, K. DORFER, T. MOLLER, R. SCHNEIDEWIND, H. MATHEIS, R. FRITZSCHE, W. ROSCH, P. POPP, J. SERS: a

versatile tool in chemical and biochemical diagnostics. **Anal Bioanal Chem.**, v. 390, p.113-124, 2008.

HUHEEY, J. E. KEITER, E. A. KEITER, R. L. **Inorganic Chemistry: Principles of structure and reactivity**. Fourth Edition. Haper Collins College Publishers, New York – EUA, 1993.

JAMIESON, L. E. ASIALA, S. M. GRACIE, K. FAULDS K. GRAHAM, D. Bioanalytical Measurements Enabled by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Probes. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 10, p. 2.1–2.23, 2017.

JING, C. FANG, Y. Experimental (SERS) and theoretical (DFT) studies on the adsorption behaviors of L-cysteine on gold/silver nanoparticles. **Chemical Physics**, v. 332, p. 27–32, 2007.

KRASNOSLOBODTSEV, A. V. TORRES, M. P. KAUR, S. VLASSIOUK, I. V. LIPERT, R. J. JAIN, M. BATRA, S. K. LYUBCHENKO, Y. L. Nano-immunoassay with improved performance for detection of cancer biomarker. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, p. 167-173, 2015.

LE RU, E. C. E.BLACKIE, M. MEYER, M. ETCHEGOIN, P. G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. **J. Phys. Chem. C**, v.111, p.13794-13803, 2007.

LE RU, E. C. ETCHEGOIN, P. G. **Principles of Surface-enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects**. Elsevier. First Edition. Amsterdam, 2009.

LE RU, E. ETCHEGOIN, P. **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy**. 1ª edição, Editora Elsevier Science, 2008.

LEE, K.C. & CHEN, S.S. The Roughness dependence of SERS of crystal violet adsorbed on silver surface. **Optics Communications**, v. 67, p. 119-123, 1988.

LEIVA, A. BONARDD, S. PINO, M. SALDÍAS, C. KORTABERRIA, G. RADIC', D. Improving the performance of chitosan in the synthesis and stabilization of gold nanoparticles. **European Polymer Journal**, v. 68, p.419–431, 2015.

LI, R. YANG, J. HAN, J. LIU, J. HUANG, M. Quantitative determination of melamine in milk using Ag nanoparticle monolayer film as SERS substrate. **Physica E**, v.88, p.164–168, 2017.

LIANG, E.J. & ENGERT, C. KIEFER, W. Surface-enhanced Raman scattering of halide ions, pyridine and crystal violet on colloidal silver with near-infrared excitation: low-wavenumber vibrational modes. **Vibrational Spectroscopy**, v. 8, p. 435-444, 1995.

LIU, H. YANG, L. LIU, J. Three-dimensional SERS hot spots for chemical sensing: Towards developing a practical analyzer. **Trends in Analytical Chemistry**, v.80, p.364–372, 2016.

LIU, R.M. KANG, Y. P. ZI, X. F. FENG, M. J. CHENG, M. SI, M. Z. The ultratrace detection of crystal violet using surface enhanced Raman scattering on colloidal Ag nanoparticles prepared by Electrolysis. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, p. 711–715, 2009.

LIU, Z. & WU, G. The electro-oxidative activity of cysteine on the Au electrode as evidenced by surface enhanced Raman scattering. **Spectrochimica Acta Part A**, v.64, p. 251–254, 2006.

LUO, S-C. SIVASHANMUGAN, K. LIAO, J-D. YAO, C-K. PENG, H-C. Nanofabricated SERS-active substrates for single-molecule to virus detection in vitro: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v.61, p.232–240, 2014.

MAHER, R. C. SERS Hot Spots. **Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization**, Editora Challa S. S. R. Kumar , 2012.

MAHOUCHE-CHERGUI, S. GUERROUCHEA, M. CARBONNIER, B. CHEHIMI, M. M. Polymer-immobilized nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 439, p. 43–68, 2013.

MALINI, M. DE SOUZA, M. F. DE OLIVEIRA, M. T. ANTUNES, L. M. G. DE FIGUEIREDO, S. G. BARBOSA, A. M. DEKKER, R. F. H. CÓLUS, I. M. S. Modulation of gene expression and cell cycle by botryosphaeran, a (1→3)(1→6)-β-d-glucan in human lymphocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 214–221, 2015.

MAMATHA, R. KHAN, S. SALUNKHE, P. SATPUTE, S. KENDURKAR, S. PRABHUNE, A. DEVAL, A. CHAUDHARI, B. P. Rapid synthesis of highly monodispersed silver nanoparticles from the leaves of *Salvadora persica*. **Materials Letters**, v. 205, p. 226-229, 2017.

MANGOLIM, C. S. DA SILVA, T. T. FENELON, V. C. DO NASCIMENTO, A. SATO, F. MATIOLI, G. Use of FT-IR, FT-Raman and thermal analysis to evaluate the gel formation of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 and determination of its rheological properties with food applicability. **Food Chemistry**, v. 232, p. 369–378, 2017.

MCCMAHON, J. M.[†] SCHATZ, G. C. GRAY, S. K. Plasmonics in the ultraviolet with the poor metals Al, Ga, In, Sn, Tl, Pb, and Bi. **Cite this: Phys.Chem. Chem. Phys**, v.15, p.5415, 2013.

MENG, W. HUB, F. ZHANG, L-Y. JIANG, X-H. LU, L-D. WANG, X. SERS and DFT study of crystal violet. **Journal of Molecular Structure**, v. 1035, p. 326–331, 2013.

MESSLER, G. L. FISCHER, P. J. TARR, D. A. **Inorganic Chemistry**. Fifth Edition. Pearson Education, Inc. Upper Saddle River – NJ – EUA, 2014.

MIZUTANI, T. OGAWA, S. MURAI, T. NAMEKI, H. YOSHIDA, T. YAGI, S. In situ UV-vis investigation of growth of gold nanoparticles prepared by solutions plasma sputtering in NaCl solution. **Applied Surface Science**, v. 354, p. 397 – 400, 2015.

MOORES, A. & GOETTMANN. The plasmon band in noble metal nanoparticle: an introduction to theory and applications. **New Journal of Chemistry**, v. 30, p. 1121 – 1132, 2006.

MROZEK, M. F. AND WEAVER, M. J. Detection and Identification of Aqueous Saccharides by Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 4069-4075, 2002.

MURPHY, C. J. THOMPSON, L. B. ALKALANG, A. M. SISCO, P.N. BOUTOS, S. P. SIVAPALAN, S. T. YANG, J. A. CHERNAK, D. J. HUANG, J. The many faces of gold nanorods. **J. Phys. Chem. Lett.**, p. 2867, 2010.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of inorganic and coordination compounds**. Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry. 5th Edition. John Wiley and Sons LTD, Outubro de 1997.

NASCIMENTO, F. C. CARNEIRO, C.E.A. DE SANTANA, H. ZAIA, D.A.M. The effect of artificial seawater on SERS spectra of amino acids-Ag colloids: An experiment of prebiotic chemistry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 251–259, 2014.

NEDDERSEN, J. CHUMANOV, G. COTTON, T. M. Laser Ablation of Metals: A New Method for Preparing SERS Active Colloids. **Applied spectroscopy**, v. 47, p. 1959-1964, 1993.

NGUYEN, M-K. SU, W-N. CHEN, C-H. RICK, J. HWANG, B-J. Highly sensitive and stable Ag@SiO₂ nanocubes for label-free SERS-photoluminescence detection of biomolecules. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 175, p. 239–245, 2017.

NGUYEN, T-A. LEE, S-W. Effect of electrodeposition cycles on the performance of gold nanostructures as SERS-active substrates. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.48, p.230–234, 2017.

NIDYA, M. UMADEVI, M. RAJKUMAR, B.J.M. Structural, morphological and optical studies of L-cysteine modified silver nanoparticles and its application as a probe for the selective colorimetric detection of Hg²⁺. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.133, p. 265–271, 2014.

O'CWIEJAA, M. BARBASZB, A. WALASC, S. ROMAND, M. PALUSZKIEWICZD, C. Physicochemical properties and cytotoxicity of cysteine-functionalized silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.160, p. 429–437, 2017.

OLEA-MEJÍA, O. FERNÁNDEZ-MONDRAGÓN, M. RODRÍGUEZ-DE LA CONCHA, G. CAMACHO-LÓPEZ, M. SERS-active Ag, Au and Ag-Au alloy nanoparticles obtained by laser ablation in liquids for sensing methylene blue. **Applied Surface Science**, v. 348, p. 66-70, 2015.

PODSTAWKA, E. OZAKI, Y. PRONIEWICZ, L. M. Part III: Surface-Enhanced Raman Scattering of amino acids and their Homodipeptide Monolayers deposited onto colloidal gold surface. **Applied Spectroscopy**, v. 59, p. 1516 – 1526, 2005.

POTARA, M. BAWASKAR, M. TIMEA, S. SWAPNIL, G. E. AVINASH, L. INGLE M. BANCIU, A. VULPOI, S. RAI, M. A. Biosynthesized silver nanoparticles performing as biogenic SERS nanotags for investigation of C26 colon carcinoma cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.133, p.296–303, 2015.

PRYMAK, O. JAKOBI, J. REHBOCK, C. EPPLE, M. BARCIKOWSKI, S. Crystallographic Characterization of laser-generated, polymer-stabilized 4 nm silver-gold alloyed nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 207, p. 442-450, 2018.

QUITEN, M. The color of finely dispersed nanoparticle. **Applied Physics B**, v. 73, p. 371 – 326, 2001.

RAJ, D. R. SUDARSANAKUMAR, C. Surface plasmon resonance based fiber optic sensor for the detection of cysteine using diosmin capped silver nanoparticles. **Sensors and Actuators A**, v. 253, p. 41–48, 2017.

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

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. Editora Unesp, 2ª edição, 2008.

SALA, O. Intensificação do Espalhamento Raman por Ressonância e por Superfície: Princípios e Aplicações. **Tese de Livre-Docência**. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 1986.

SALAMANA, H. E. AZIZ, M. S. A. SAAD, G. R. Thermal properties, crystallization and antimicrobial activity of chitosan biguanidine grafted poly (3-hydroxybutyrate) containing silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 19-27, 2018.

SANGHI, R. VERMA, P. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 501–504, 2009.

SANT'ANA, A. C. CORIO, P. TEMPERINI, M. L. A. O Efeito Sers Na Análise De Traços: O Papel Das Superfícies Nanoestruturadas. **Quim. Nova**, v. 29, p.805-810, 2006.

SENAPATI, S. SRIVASTAVA, S. K. SINGH, S. B. KULKARNI, A. R. SERS active Ag encapsulated Fe@SiO₂ nanorods in electromagnetic wave absorption and crystal violet detection. **Environmental Research**, v. 135, p. 95–104, 2014.

SIKDER, M. LEAD, J. R. CHANDLER, G. T. BAALOUSHA, M. A rapid approach for measuring silver nanoparticle concentration and dissolution in seawater by UV–Vis. **Science of The Total Environment**, v. 618, p. 597-607, 2018.

SILVA, I. R. MONTEIRO, K. N. MARTINEZ, P. F. IZELI, N. L. VASCONCELOS, A. F. D. CARDOSO, M. S. DA SILVA, M. L. C. BARBOSA, A. M. DEKKER, R. F. H. DA SILVA, G. V. J. DE MORAES, L. A. B. Purificação e caracterização de uma gentioexaose obtida de botriosferana por hidrólise ácida parcial. **Quím. Nova**, v.31, 2008.

SILVA, M. L. C. FUKUDA, E. K. VASCONCELOS, A. F. D. DEKKER, R. F. H. MATIAS, A. C. MONTEIRO, N. K. CARDOSO, M. C. BARBOSA, A. M. SILVEIRA, J. L. M. SASSAKID, G. L. CARBONERO, E. R. Structural characterization of the cell wall D-

glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 793-798, 2008.

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

STEWART, S. FREDERICKS, P.M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 55, p. 1641–1660, 1999.

Structure of Gentian Violet. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 12 de março de 2018.

SUN, Y. MAYERS, B. HERRICKS, T. XIA, Y. Polyol synthesis of uniform silver nanowires: A plausible growth mechanism and the supporting evidence. **Nano Lett**, p.995, 2003.

SYNYTSYA, A. COPÍKOVÁ, J. MATEJKAB, P. MACHOVIC, V. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 97–106, 2003.

TANG, J. GAO, K. OU, Q. FU, X. MAN, S-Q. GUO, J. LIU, Y. Calculation extinction cross sections and molar attenuation coefficient of small gold nanoparticles and experimental observation of their UV-vis spectral properties. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 191, p. 513 – 520, 2018.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, p. 71–78, 2003.

TOOMA, S. H. BONACIN, J. A. ARAKI, K. TOMA, H-E. Controlled Stabilization and Flocculation of gold nanoparticles by Means of 2-Pyrazin-2-Ylethanethiol and Pentacyanidoferrate (II) complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 3356 – 3364, 2007.

VINOD, M. GOPCHANDRAN, K. G. Ag@Au core–shell nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in water: Effect of plasmon coupling and their SERS performance.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v.149, p. 913–919, 2015.

VINOD, M. GOPCHANDRAN, K. G. Au, Ag e Au:Ag colloidal nanoparticles synthesized by pulsed laser ablations as SERS substrates. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 24, p. 569-578, 2014.

WANG, Y. & NI, Y. Combination of UV-vis spectroscopy and chemometrics to understand protein-nanomaterial conjugate: A case study on human serum albumin and gold nanoparticles. **Talanta**, v. 119, p. 320-330, 2014.

WANG, Y. CHEN, H. DONG, S. WANG, E. Fabrication and characterization of SERS-active silver clusters on glassy carbon. **Journal Of Raman Spectroscopy**, v.38, p.515–521, 2007.

WANG, Y. YAN, B. CHEN, L. SERS Tags: Novel Optical Nanoprobes for Bioanalysis. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 1391-1428, 2013.

WEI, D. YE, Y. JIA, X. YUAN, C. QIAN, W. Chitosan as an active support for assembly of metal nanoparticles and application of the resultant bioconjugates in catalysis. **Carbohydrate Research**, v. 345, p.74–81, 2010.

WEI, W. HUANG, Q. Preparation of cellophane-based substrate and its SERS performance on the detection of CV and acetamiprid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.193, p. 8–13, 2018.

WIERCIGROCH, E. SZAFRANIEC, E. CZAMARA, K. PACIA, M. Z. MAJZNER, K. KOCHAN, K. KACZOR, A. BARANSKA, M. MALEK, K. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 317–335, 2017.

WILLETS, K. A. & DUYNE, R. P. V. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemical**, v. 58, p. 267–97, 2007.

XIANG, C. LI, R. ADHIKARI, B. SHE, Z. LI, Y. KRAATZ, H-B. Sensitive electrochemical detection of Salmonella with chitosan–gold nanoparticles composite film. **Talanta**, v.140, p.122–127, 2015.

YADAV, P. SINGH, S. P. RENGANB, A. K. SHANAVASA, A. SRIVASTAVA, R. Gold laced bio-macromolecules for theranostic application. **International Journal of Biological Macromolecules**, *In Press*, 2017.

YANG, C. XU, L. ZHOU, Y. ZHANG, X. HUANG, X. WANG, M. HAN, Y. ZHAI, M. WEI, S. LI, J. A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p. 1297–1305, 2010.

YUAN, Y. PANWAR, N. YAP, S.H.K. WU, Q. ZENG, S. XU, J. TJIN, S.C. SONG, J. QU, J. YONG, K-T. SERS-based ultrasensitive sensing platform: An insight into desing and pratical applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 337, p. 1-33, 2017.

ZHANG, K. ZENG, T. TAN, X. WU, W. TANG, Y. ZHANG, H. A facile surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection of rhodamine 6G and crystal violet using Au nanoparticle substrates. **Applied Surface Science**, v. 347, p.569–573, 2015.

ZHANG, Q. WANG, X-D. TIAN, T. CHU, L-Q. Incorporation of multilayered silver nanoparticles into polymer brushes as 3-dimensional SERS substrates and their application for bacteria detection. **Applied Surface Science**, v. 407, p.185-191, 2017.

ZHOU, H. SU, G. JIAO, P. YAN, B. Accelerating the Multifunctionalization of Therapeutic Nanoparticles by Using a Multicomponent Reaction. **Chem. Eur. J.**, v.18, p.5501 – 5505, 2012.

ZHU, F. DU, B. XU, B. A critical review on production and industrial applications of betaglucans. **Food Hydrocolloids**, v.52 p.275-288, 2016.

ZHU, K. HONG, Z. KANG, S-Z. QIN, L. LI, G. LI, X. Assembly of potassium niobate nanosheets/silver oxide composite films with good SERS performance towards crystal violet detection. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 115, p. 69–74, 2018.

ZHU, Y. CAO, Y. SUN, X. WANG, X. Amperometric Immunosensor for Carbofuran Detection Based on MWCNTs/GS-PEI-Au and AuNPs-Antibody Conjugate. **Sensors**, v.13, p.5286-5301, 2013.