República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102013024093-1 A2

(22) Data do Depósito: 19/09/2013

(43) Data da Publicação: 24/11/2015

(RPI 2342)

(54) Título: SUBSTRATO FLEXÍVEL PORTÁTIL PARA DETECÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS USANDO FENÔMENOS DE AMPLIFICAÇÃO SERS E SERRS POR ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN E PROCESSO DE OBTENÇÃO DO DITO SUBSTRATO

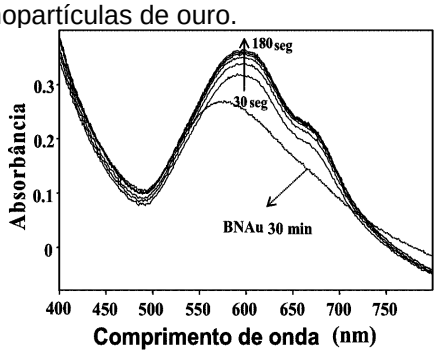
(51) Int. Cl.: G01N 21/65; G01J 3/44

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) Inventor(es): ALDO ELOIZO JOB, FLÁVIO CAMARGO CABRERA, RICARDO FLÁVIO AROCA, CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO, PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI

(74) Procurador(es): FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) Resumo: SUBSTRATO FLEXÍVEL PORTÁTIL PARA DETECÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS USANDO FENÔMENOS DE AMPLIFICAÇÃO SERS E SERRS POR ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN E PROCESSO DE OBTENÇÃO DO DITO SUBSTRATO. É descrita a invenção de um substrato flexível portátil para detecção e análises químicas usando fenômenos de amplificação SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) e SERRS (Surface-Enhanced Resonance Spectroscopy) por espectroscopia micro-Raman e respectivo processo de obtenção do dito substrato que provê um substrato de borracha natural impregnando com nanopartículas de ouro.



SUBSTRATO FLEXÍVEL PORTÁTIL PARA DETECÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS USANDO FENÔMENOS DE AMPLIFICAÇÃO SERS E SERRS POR ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN E PROCESSO DE OBTENÇÃO DO DITO SUBSTRATO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um substrato flexível portátil para detecção e análises químicas usando fenômenos de amplificação SERS (*Surface Enhanced* Raman *Spectroscopy*) e SERRS (*Surface-Enhanced Resonance Spectroscopy*) por espectroscopia micro-Raman e o processo de obtenção do dito substrato. Mais especificamente compreende um substrato de borracha natural impregnado com nanopartículas de ouro.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O efeito Raman é o espalhamento inelástico da luz que incide sobre uma molécula, com deslocamento do comprimento de onda devido à interação das moléculas com os fotos incidentes. O espalhamento Raman, determinado prioritariamente pela estrutura da molécula, é extremamente sensível a sua simetria e excelente para determinar vibrações moleculares.

O estado da técnica descreve o uso de nanopartículas para obtenção do efeito SERS (Surface Enhanced *Raman* Spectroscopy) e SERRS (Surface-Enhanced Resonance Spectroscopy) envolvendo diversos métodos de preparação e arquiteturas específicas. No entanto, a distribuição aleatória ou não uniforme das nanopartículas obtidas por redução eletroquímica ou ciclos de redução (ORC-EC) ou ainda por deposição a vácuo possibilita a análise de amplificação de superfície, porém com baixa reprodutibilidade.

Outro método para a fabricação de meios para análises SERS e SERRS é baseado na síntese química de nanopartículas, em solução

aquosa ou não, dependendo do sal metálico utilizado. O controle de tamanho e forma – que pode ser esférica, cúbica, triangular, nanotubos, bastões, entre outros – também é altamente dependente da forma de processamento ou do tipo de metal utilizado, da concentração de solução, da temperatura, dos agentes de redução e de estabilização, ou ainda do pH de solução utilizada na síntese.

Outros métodos para obtenção de alta organização de nanoestruturas para a construção de substrato ativos SERS e SERRS são Langmuir-Blodgett (LB), nanolitografia, deposição de camadas intercaladas baseado nas interações físico-químicas (layer-by-layer) entre substratos e moléculas.

Em geral, substratos sólidos como Silício (Si), vidro, óxido de índio dopado com estanho (ITO), quartzo ou ouro, são comumente utilizados para a identificação de partículas e/ou moléculas por meio dos efeitos de amplificação de superficie provenientes de nanoestruturas imobilizadas na superfície dos substratos.

No entanto, os substratos existentes são rígidos, e consequentemente frágeis, estando sujeitos a fraturas durante seu manuseio. Os substratos desenvolvidos apresentam a possibilidade de mobilidade e auto-sustentabilidade devidas à flexibilidade e estabilidade da borracha natural, evitando a perda dos sensores por falhas mecânicas, quedas, entre outros, como comumente ocorre quando utilizados substratos ou matrizes fabricadas de vidro ou quartzo, por exemplo.

Além disso, as propriedades de biocompatibilidade de ambos os materiais utilizados na preparação desses substratos (borracha natural e nanopartículas de ouro) apresentam propriedades de biocompatibilidade, e também atuam como amplificadores para a identificação de compostos mesmo em concentrações-traço.

SUMÁRIO

É característica da invenção um substrato flexível portátil para detecção e análises químicas usando fenômenos de amplificação SERS e SERRS por espectroscopia micro-Raman que provê substratos produzidos a partir de borracha natural, com características de flexibilidade (portabilidade) sem a perda significativa do fator de amplificação.

É característica da invenção um substrato flexível portátil para detecção e análises químicas usando fenômenos de amplificação SERS e SERRS por espectroscopia micro-Raman que evita a perda dos sensores por falhas mecânicas, quedas, entre outros, como comumente ocorre quando utilizados substratos ou matrizes fabricadas de vidro ou quartzo, por exemplo.

É característica da invenção um substrato flexível portátil para detecção e análises químicas usando fenômenos de amplificação SERS e SERRS por espectroscopia micro-Raman de borracha natural e nanopartículas de ouro que permite a utilização na fabricação de sensores biologicamente compatíveis, visto que ambos os materiais possuem tais propriedades, atuando como amplificador para a identificação de compostos mesmo em baixa concentração.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 apresenta a espectroscopia UV-Vis de substrato de borracha natural e nanopartículas de ouro (30 minutos de redução) para diferentes tempos de deposição de moléculas de azul de metileno.

A figura 2 apresenta a representação gráfica da intensidade da banda de plasmon resonance a 595 nm para diferentes tempos de deposição de azul de metileno sobre membranas de borracha natural para 30 minutos de redução.

A figura 3 apresenta a espectroscopia UV-Vis das membranas de azul de metileno e de borracha natural e nanopartículas de ouro.

A figura 4 apresenta a espectroscopia micro-Raman de membranas de azul de metileno e borracha natural e nanopartículas de ouro (30 minutos de redução) comparado ao espectro obtido a partir da análise de membranas de borracha natural pura com a deposição de moléculas de azul de metileno.

A figura 5 apresenta a espectroscopia micro-Raman de membranas de azul de metileno e borracha natural e nanopartículas de ouro para os diferentes tempos de redução de nanopartículas de ouro, com tempo de deposição de moléculas de azul de metileno mantido em 180 segundos. Avaliação da intensidade relativa do pico em 1622 cm^{-1} em função do tempo de redução de nanopartículas de ouro.

A figura 6 apresenta o mapeamento superficial de área (2D), passo de 2 µm, número de onda 1622 cm^{-1}, membrana de azul de metileno e borracha natural e nanopartículas de ouro para 30 minutos de redução.

A figura 7 apresenta o espectro micro-Raman, laser 785 nm, membrana de borracha natural e nanopartículas de ouro para 30 minutos de redução recoberta com tiofenol e a figura 7B apresenta o mapeamento superficial de área (2D), passo de 2 µm, membrana de borracha natural e nanopartículas de ouro para 30 minutos de redução recobertas com tiofenol.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O substrato flexível portátil para detecção e análises químicas usando fenômenos de amplificação SERS e SERRS por espectroscopia micro-Raman, objeto da presente invenção, compreende uma membrana de borracha natural com nanopartículas de ouro incorporadas na superfície da membrana.

As membranas de borracha natural são preparadas por meio do

método *casting* de tratamento térmico, no qual o látex estabilizado é suportado em placas de vidro e mantido em estufa por 10 horas até a secagem completa, a temperatura de 65 °C, provendo membranas de aproximadamente 0,5 mm de espessura. O látex é inicialmente estabilizado por meio da adição de hidróxido de amônio em concentração volumétrica de 2%.

As membranas de borracha natural são inseridas em uma solução aquosa de sais de cloreto de ouro (3,1 10^{-4} mol/L), a 80 °C, entre 6 a 60 minutos, sendo formadas nanopartículas de ouro que são incorporadas na superfície das membranas de borracha natural e, devido à porosidade da superfície, penetrando no volume das membranas em até 3 µm.

A borracha natural, poli-1,4-cis-isopreno, apresenta transição vítrea aproximadamente em -67 °C, o que lhe confere flexibilidade à temperatura ambiente.

A formação das nanopartículas, ativada diretamente pela inserção das membranas de borracha natural na solução aquosa de sais de cloreto de ouro, elimina a necessidade de utilização de agentes de redução comuns, como citrato, borohidreto, hidroxilamina entre outros, bem como a utilização de compostos poliméricos para a estabilização das nanopartículas.

Os testes dos efeitos de amplificação SERRS e SERS foram realizados por *dipping* (imersão direta) das membranas de borracha natural e nanopartículas de ouro em soluções de azul de metileno (10^{-3} mol/L) e tiofenol (10^{-4} mol/L), respectivamente, como materiais de análise.

Para validar a utilização das membranas nanoestruturadas de borracha natural com nanopartículas de ouro como sensores químicos, foram depositadas moléculas de fenotiazina (azul de metileno),

otimizando as condições de tempo de redução de ouro, tempo de deposição de moléculas de azul de metileno, entre outras, analisando paralelamente a formação das moléculas de azul de metileno através da espectroscopia UV-Vis, verificando os efeitos de amplificação de superfície através da espectroscopia micro-Raman (laser 633 nm), caracterizando as membranas de borracha natural com nanopartículas de ouro como substrato ativo SERRS.

Testes para verificação do efeito SERS foram realizados por meio da deposição de moléculas de tiofenol sobre a superfície das membranas de borracha natural e nanoparticulas de ouro e avaliadas utilizando um equipamento operando com laser 785 nm.

Na técnica de espectroscopia micro-Raman, os espectros são gerados por meio da interação entre os fótons incidentes e os átomos, de modo a se comportarem de três maneiras: (i) espalhamento Rayleigh: quando o comprimento de onda do fóton espalhado é igual ao número de onda do fóton incidente, ou seja, são definidos por colisões elásticas (que não desprendem energia); (ii) espalhamento Stokes: o número de onda do fóton espalhado é menor do que o incidente; e (iii) espalhamento anti-Stokes: no qual o número de onda apresentado após o espalhamento é maior que o pertencente ao fóton incidente.

O efeito *Surface-enhanced Raman Scattering (SERS)* teoricamente é atingido por meio da interação entre os fótons incidentes e os átomos, de modo que aja ressonância entre o feixe incidente de radiação eletromagnética e o *plasmon* de ressonância superficial atribuído às partículas metálicas do substrato. Deste modo, se o campo elétrico gerado tem a mesma freqüência de oscilação que as partículas, o número de fótons espalhados será amplificado e a relação sinal/ruído é evidencialmente melhorada. Os fatores de intensificação podem ser amplificados em 10^9 vezes o espalhamento Raman permitindo a

detecção de uma única molécula. Sabe-se da utilização de nanopartículas de ouro, e colóides de ouro e prata como meios passivos a obter o efeito SERS.

O equipamento micro-Raman utilizado possui detector CCD, laser de 632,8 nm e 785 nm, e um microscópio ótico acoplado, com lentes objetivas de 50x com cerca de 1 μm^2 de resolução espacial. O tempo de coleta utilizado foi de 10 s e a resolução espectral é cerca de 4 cm^{-1}. O mapeamento bidimencional foi adquirido por meio de um controle de software (XYZ) monitorado com passo de 2 µm.

Nas Figuras 1 e 2, observa-se o estudo através da espectroscopia UV-Vis para a membrana de borracha natural / ouro para 30 minutos de redução de ouro para diferentes tempos de deposição de moléculas de azul de metileno.

As bandas em 595 e 667 nm são atribuídas a transições $\pi - \pi^*$ relativas aos dímeros e monômeros, respectivamente, nas moléculas de azul de metileno, sobre as partículas de ouro reduzidas na membrana de borracha natural. A intensidade das bandas de absorção das moléculas de azul de metileno em 595 nm apresenta um aumento exponencial relativo ao aumento na quantidade de moléculas adsorvidas sobre o substrato, atingindo um platô em 180 segundos.

A grande variação observada na intensidade das bandas de absorção entre os intervalos dos primeiros tempos de deposição é atribuída ao fato de que as primeiras moléculas depositadas sofrem maior amplificação de superfície devido ao contato direto com as nanopartículas de ouro.

A análise de crescimento de moléculas de azul de metileno sobre membranas nanoestruturadas de borracha natural com partículas de ouro preparadas para diferentes tempos de redução foi avaliada por meio de espectroscopia UV-Vis, conforme apresentado na figura 3.

A banda atribuída ao *plasmon* de ressonância das partículas de ouro, em 666 nm, é observada em conjunto com a banda de absorção do azul de metileno para as membranas de borracha natural e nanopartículas de ouro. As nanopartículas de ouro foram obtidas em até 30 minutos de redução e o tempo de deposição de moléculas de azul de metileno fixado para todas as membranas foi de 3 minutos. Acredita-se no efeito de intensificação das bandas de azul de metileno nesta faixa de comprimentos de onda, sendo que a partir de 60 minutos a banda referente ao ouro se sobressai em intensidade relativa, impossibilitando a visualização da banda de azul de metileno.

O estudo por meio da espectroscopia micro-Ramam para as membranas de borracha natural com nanopartículas de ouro para diferentes tempos de redução com a incorporação de moléculas de azul de metileno é apresentado nas figuras 4 e 5.

São observados pequenos picos atribuídos à deposição de moléculas de azul de metileno sobre a superfície das membranas de borracha natural pura, sofrendo grande intensificação quando as moléculas são depositadas sobre as membranas de borracha natural e nanopartículas de ouro até 30 minutos de redução de nanopartículas, havendo também uma melhoria na relação sinal-ruído, e após este tempo, o sinal perde em intensidade.

O principal pico característico das moléculas de azul de metileno é obtido em 1622 cm^{-1} associado ao estiramento C-C acoplado a flexão de C-H no plano ligado ao anel aromático, e estiramento C-N acoplado ao estiramento C-C, atribuições realizadas baseando-se em cálculos teóricos utilizando a base de dados DFT/6-31G comparando à literatura de moléculas similares a de azul de metileno. A análise de crescimento das bandas apresentadas em 1622 cm^{-1} para as moléculas de MB (Figura 5(b)) demonstram uma amplificação de caráter exponencial na

intensidade das bandas até 30 minutos de redução. Este fato comprova a eficiência das membranas de borracha natural e nanopartículas de ouro como substrato ativo para análise química, através dos efeitos de amplificação de superfície (SERRS), além de apresentar uma relação entre a intensificação na banda de absorção das moléculas e a amplificação do efeito SERRS obtido das análises micro-Raman, pois a partir de 30 min de redução não se podem observar as bandas características de moléculas de azul de metileno por meio da espectroscopia UV-Vis, podendo-se afirmar a inter-relação entre *plasmon* de ressonância das nanopartículas e Amplificação Raman (SERS).

Para o cálculo da média do fator de amplificação (EF), é utilizada a relação SERRS/RRS (fótons avaliados por meio da análise borracha natural / ouro em função do sinal do equipamento).

A relação SERRS/RRS para a banda 1622 cm^{-1}, com equipamento operando a 1% da potência do laser utilizado para análise Raman, tem-se:

$$\left(\frac{114{,}911\ counts}{3{,}450\ counts} * \frac{100\%}{1\%}\right),$$

sendo obtida uma média estimada de EF próximo de 10^3.

A fim de monitorar a distribuição espacial das nanoestruturas responsáveis pela amplificação de superfície, os espectros SERRS foram coletados ponto a ponto ao longo de uma área de 60 µm x 60 µm da superfície, a um passo de 2 µm, num total de 961 espectros, conforme apresentado na figura 6.

A intensidade da banda 1622 cm^{-1} é utilizada para formar o mapeamento de superfície com uma resolução espacial de 50x na microscopia. As cores mais claras representam maiores intensidades. Os resultados representam uma boa dispersão das nanopartículas (isoladas

ou agregadas) sobre a superfície das membranas de borracha natural. Esta distribuição, bem como a forma e tamanho das nanopartículas, são intimamente relacionadas aos efeitos de amplificação Raman SERS e SERRS, comprovando boa homogeneidade do substrato.

Para avaliar o efeito de amplificação SERS para as membranas de borracha natural e nanopartículas de ouro, foram utilizadas amostras de 30 minutos de redução por *dipping* do filme em solução de 10^{-4} M de tiofenol, lavando o excesso adsorvido em água destilada, operando o equipamento com laser 785 nm. É importante mencionar que o tiofenol não absorve na região do visível, portanto o espectro coletado é relativo ao efeito SERS (amplificação espontânea), ao invés de avaliar os fenômenos de amplificação ressonante.

Conforme apresentado na figura 7, é possível verificar a formação dos picos característicos ao tiofenol, visto que a membranas de borracha natural não apresentam picos característicos quando avaliadas a potências tão baixas quanto as utilizadas nas análises micro-Raman para avaliação SERS ou SERRS.

Ainda, por meio do mapeamento superficial 2D, apresentado na figura 7B, boa distribuição das nanoestruturas responsáveis pelo fenômeno de amplificação relativo ao efeito SERS, semelhante aos resultados obtidos para as moléculas de azul de metileno.

REIVINDICAÇÕES

1. SUBSTRATO FLEXÍVEL PORTÁTIL PARA DETECÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS USANDO FENÔMENOS DE AMPLIFICAÇÃO SERS E SERRS POR ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN **caracterizado por** compreender uma membrana de borracha natural com nanopartículas de ouro incorporadas na superfície da membrana.
2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DO SUBSTRATO REIVINDICADO EM 1, **caracterizado por** compreender, no mínimo, as etapas de:
   a) estabilização da borracha natural líquida;
   b) vertimento da borracha natural líquida em uma superfície plana;
   c) secagem da borracha natural líquida;
   d) imersão das membranas de borracha natural em solução aquosa de rica em íons ouro.
3. PROCESSO DE OBTENÇÃO DO SUBSTRATO REIVINDICADO EM 1, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato da estabilização da borracha natural líquida ser estabilizada particularmente pela adição de hidróxido de amônio em concentração entre 1 e 3% em volume.
4. PROCESSO DE OBTENÇÃO DO SUBSTRATO REIVINDICADO EM 1, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato da secagem da borracha natural ser por um período mínimo de 9 horas em temperatura entre 60 e 70 ºC.
5. PROCESSO DE OBTENÇÃO DO SUBSTRATO REIVINDICADO EM 1, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato da imersão das membranas de borracha natural ser particularmente em solução aquosa de cloreto de ouro em concentração entre 2,9 x 10^{-4} mol/L e 3,2 x 10^{-4}, em temperatura entre 70 e 90 °C, por um período de tempo entre 6 a 60 minutos.

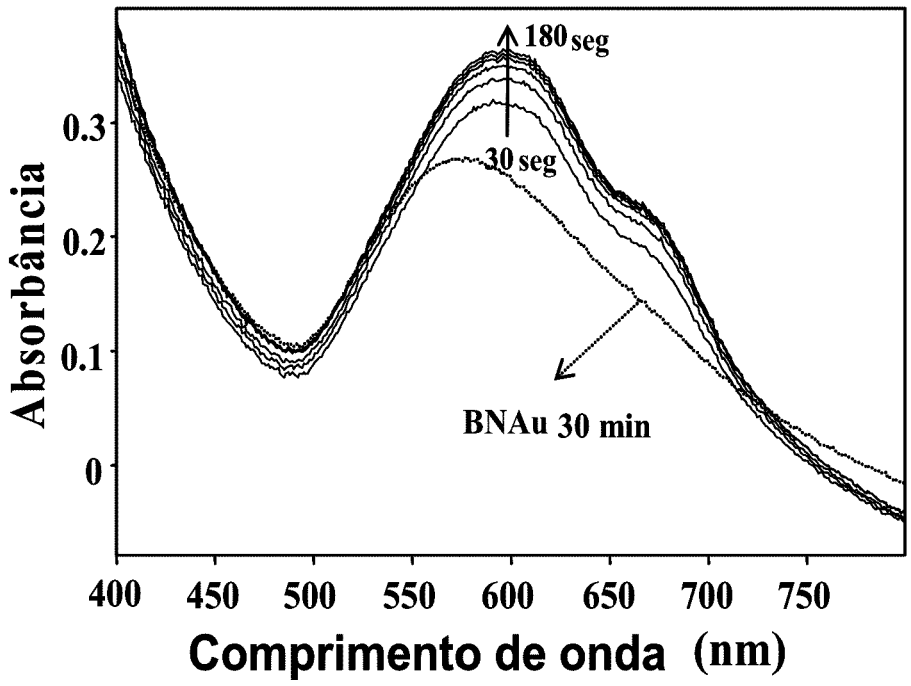


Figura 1

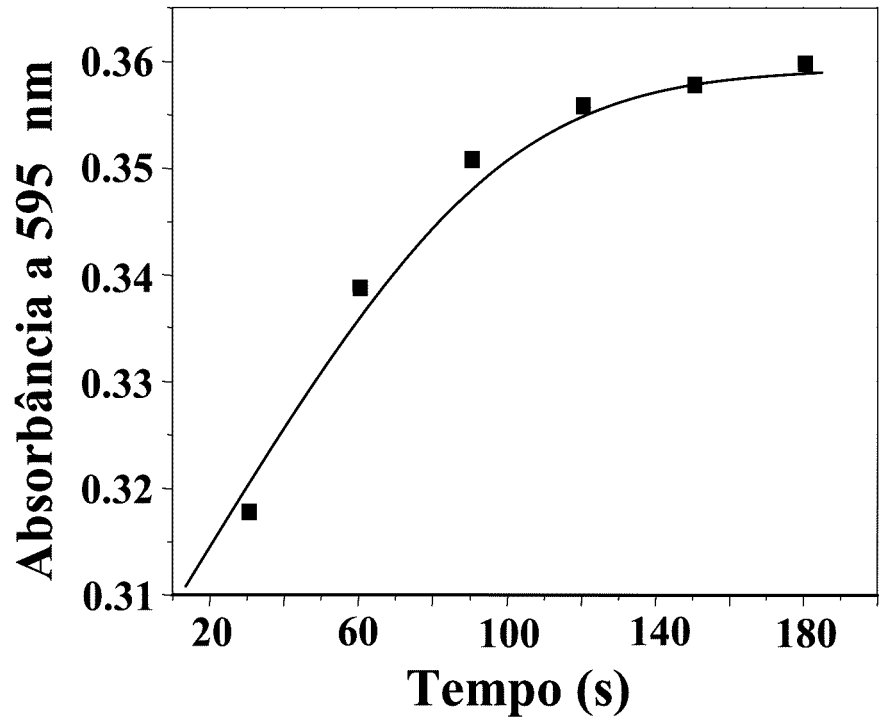


Figura 2

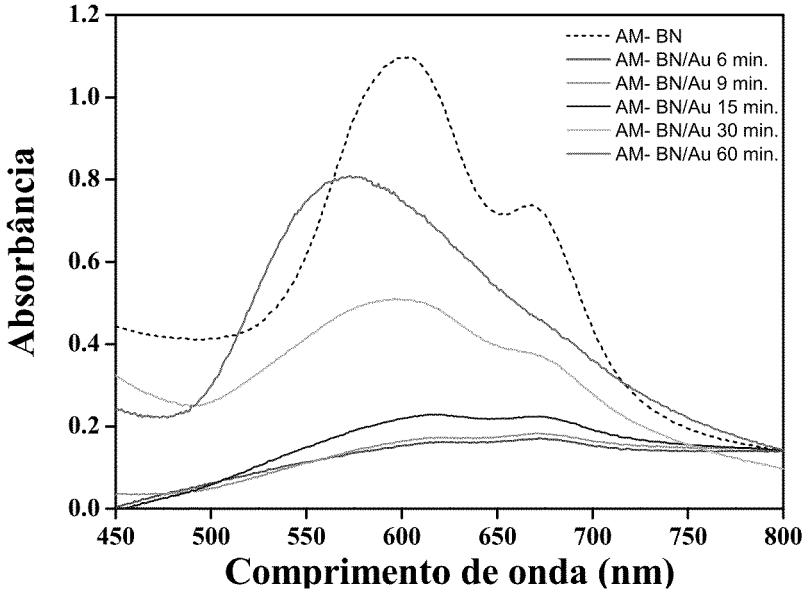


Figura 3

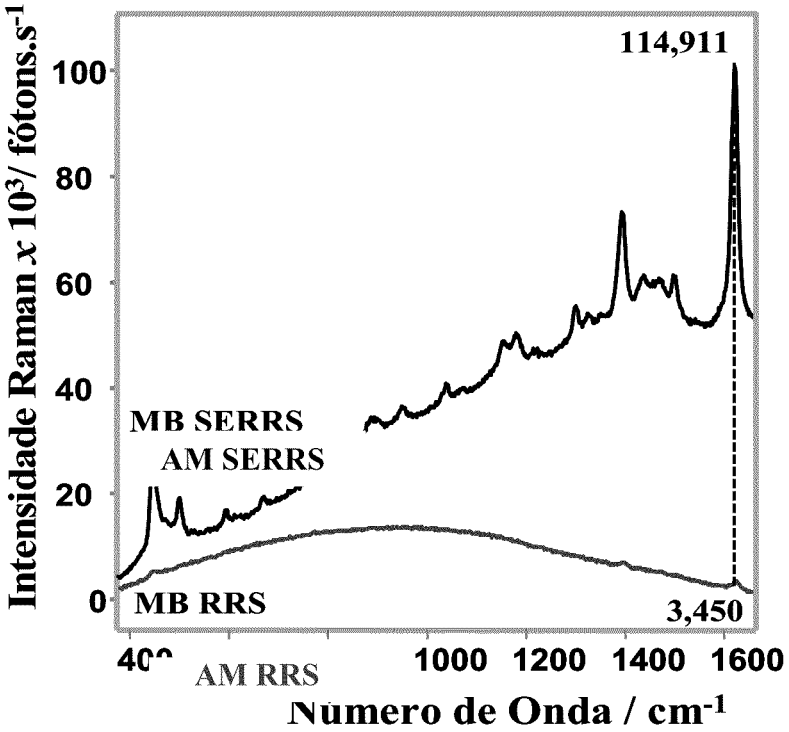


Figura 4

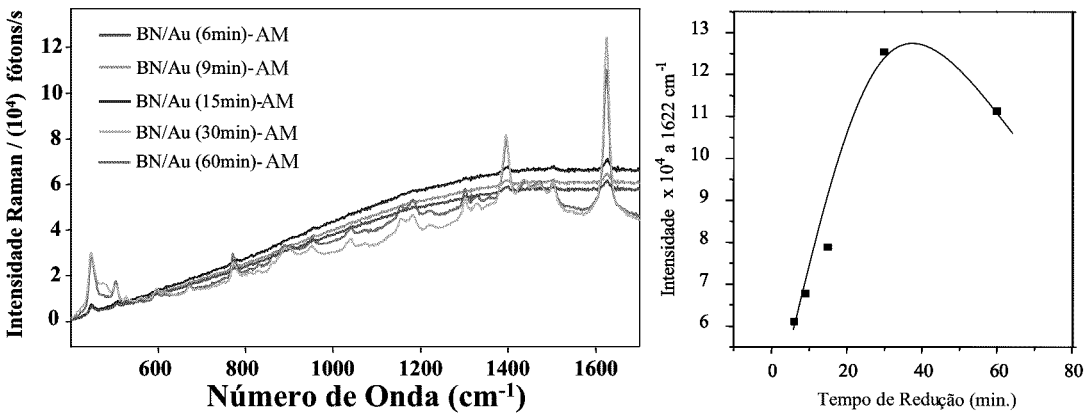


Figura 5

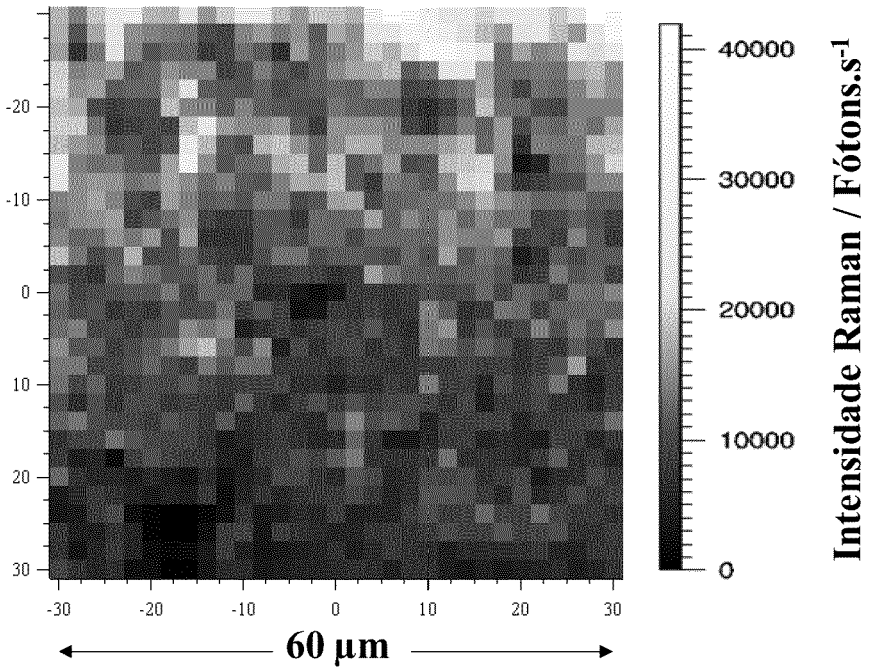


Figura 6

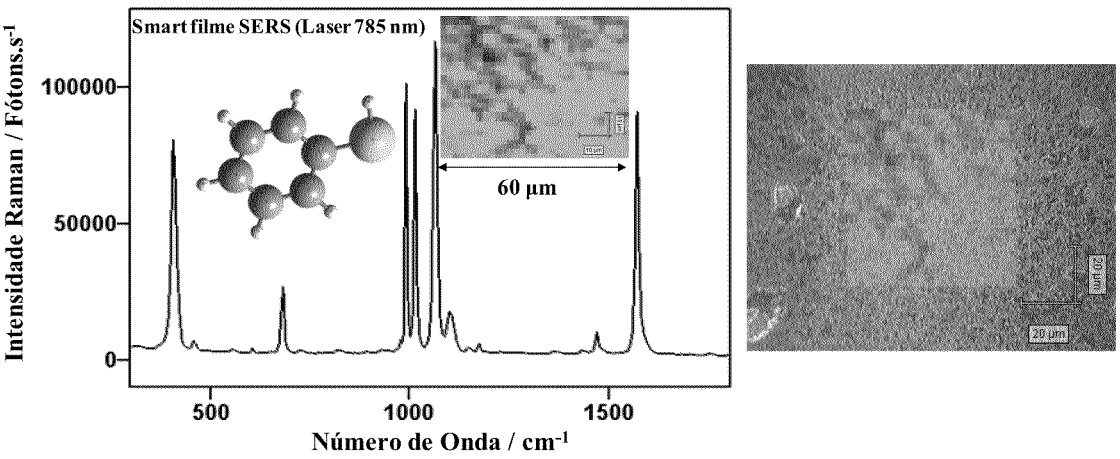

Smart filme SERS (Laser 785 nm)
Intensidade Raman / Fótons.s-1
100000
50000
0
500
1000
1500
Número de Onda / cm-1
60 µm
20 µm
20 µm

Figura 7

RESUMO

SUBSTRATO FLEXÍVEL PORTÁTIL PARA DETECÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS USANDO FENÔMENOS DE AMPLIFICAÇÃO SERS E SERRS POR ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN E PROCESSO DE OBTENÇÃO DO DITO SUBSTRATO

É descrita a invenção de um substrato flexível portátil para detecção e análises químicas usando fenômenos de amplificação SERS (*Surface Enhanced* Raman *Spectroscopy*) e SERRS (*Surface-Enhanced Resonance Spectroscopy*) por espectroscopia micro-Raman e respectivo processo de obtenção do dito substrato que provê um substrato de borracha natural impregnando com nanopartículas de ouro.