

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais
(POSMAT)



**Síntese de nanopartículas de ouro para
amplificação do espalhamento Raman (SERS)
e da fluorescência (SEF) visando aplicações
sensoriais**

Tese de Doutorado
Sabrina Aléssio Camacho

Presidente Prudente

2018

Sabrina Aléssio Camacho

**Síntese de nanopartículas de ouro para amplificação do
espalhamento Raman (SERS) e da fluorescência (SEF)
visando aplicações sensoriais**

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutora à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração “Materiais Poliméricos, Cerâmicos, Híbridos, e Nano Estruturais”, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

Presidente Prudente, SP

2018

Camacho, Sabrina Aléssio.

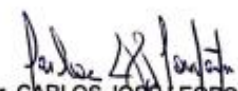
Síntese de nanopartículas de ouro para
amplificação do espalhamento Raman (SERS) e da
fluorescência (SEF) visando aplicações
sensoriais/ Sabrina Aléssio Camacho, 2018
179 f. : il.

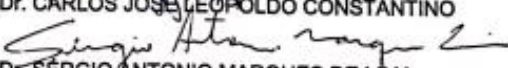
Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino
Tese (Doutorado)- Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Presidente Prudente, 2018

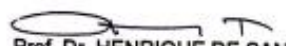
1. Nanopartículas de ouro. 2. SERS. 3. SEF. I.
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Ciências e Tecnologia. II. Título

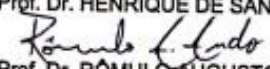
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE SABRINA ALESSIO CAMACHO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

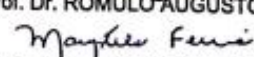
Aos 24 dias do mês de janeiro do ano de 2018, às 14:00 horas, no(a) Sala de reuniões do Hotel Aruã em Presidente Prudente/SP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO - Orientador(a) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. SÉRGIO ANTONIO MARQUES DE LIMA do(a) Departamento de Química e Bioquímica / UNESP / Câmpus de Presidente Prudente, Prof. Dr. HENRIQUE DE SANTANA do(a) Departamento de Química / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, Prof. Dr. RÔMULO AUGUSTO ANDO do(a) Departamento de Química Fundamental / Universidade de São Paulo, Profa. Dra. MARYSTELA FERREIRA do(a) Campus Sorocaba / Universidade Federal de São Carlos, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de SABRINA ALESSIO CAMACHO, intitulada **Efeito da incorporação de nanopartículas metálicas na amplificação do espalhamento Raman (SERS) e da fluorescência (SEF) em filmes nanoestruturados de metaloporfirina**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO


Prof. Dr. SÉRGIO ANTONIO MARQUES DE LIMA


Prof. Dr. HENRIQUE DE SANTANA


Prof. Dr. RÔMULO AUGUSTO ANDO


Profa. Dra. MARYSTELA FERREIRA

A banca sugere alterações do título para "Síntese de nanopartículas de ouro para amplificação do espalhamento Raman (SERS) e da fluorescência (SEF) visando aplicações sensoriais".

*Dedico este trabalho a minha família:
minha filha Júlia, meu esposo Pedro,
meus pais Camacho e Neidinha, meu
irmão Danilo.*

Agradecimentos

Ao “Papai e Mamãe do Céu”: pela força, fé e coragem que me dão dia-a-dia para vencer as barreiras pessoais e profissionais.

Ao meu orientador Casé: pela amizade e pelos ensinamentos científicos e pessoais. Pelos “puxões de orelha” quando necessários e pelos elogios quando merecidos. Obrigada pela paciência e cuidado com o nosso trabalho.

À minha coorientadora Aninha: pela amizade e pelos primeiros passos científicos, quando eu mal sabia o que era um bécquer. Obrigada por fazer parte dessa história.

Ao Prof. Alexandre Brolo, meu orientador durante o estágio BEPE. Pela oportunidade em trabalhar no seu grupo de pesquisa durante um ano que estive no Canadá. Foi uma experiência enriquecedora.

Ao meu esposo Pedro (Morzão): pelo amor incondicional. Por acreditar em mim e por sempre me impulsionar a ser melhor. Por me mostrar que além de parceiro, namorado e amigo é um maravilhoso pai.

À nossa pequena Júlia: por nos mostrar que o amor pode ser ainda maior. Por tornar as coisas da vida tão simples e clara e por fazer nossos dias mais felizes. Jamais aprendi tanto em tão pouco tempo. Obrigada filha por me transformar dia-a-dia!

Aos meus pais: Neidinha e Camacho, pela base sólida e pelo amor que dedicaram e dedicam a mim. Esse amor me fez forte! Ao meu tato Danilo: pelas brincadeiras quando crianças que agora se traduz em companheirismo.

À minha segunda família: Mari, Pedrão e Nat. Obrigada por sempre estarem presentes, pelo carinho e amor que têm comigo e com nossa pequena.

Aos professores do DF, DQB e POSMAT e suas respectivas secretárias: pela minha capacitação e formação profissional.

Ao querido mestre e amigo Dr. Ricardo Aroca: pelas contribuições a esse trabalho e pela lição de vida. Acima de tudo um ser humano admirável. E a sua esposa Pat, que com delicadeza e paciência não media esforços para me ensinar.

Aos amigos do “NOIX”: por me receberem no grupo e pela convivência diária. Pelas conversas, cafés, churrascos, risadas e trocas de experiências pessoais e científicas.

À “família Carga Pesada”: Manú, Li, Lú e Ariadne. Por tantas vezes que foram minha família quando não os tinha por perto. Por tudo que compartilhamos, desde a comida até os momentos mais especiais na vida de cada uma.

Aos amigos que ganhei por “tabela”: Diogão, Toddy, Deuber, Coração, Caito, Erikinha, Julião, Dri e Dapontinha. É sempre bom rever vocês. Obrigada por me acolherem na “família Balão Mágico”.

À FAPESP pelo suporte financeiro (processo nº 2013/01897-4).

Resumo

O presente trabalho abrange a síntese de nanopartículas metálicas com propriedades plasmônicas específicas incorporadas a filmes finos nanoestruturados de moléculas de interesse, como metaloporfirinas e outras. Nanopartículas de ouro (AuNPs 16 nm) foram incorporadas a filmes Langmuir-Blodgett (LB) de metaloporfirina visando o efeito SERS (espalhamento Raman amplificado em superfície). A incorporação das AuNPs se deu por codeposição, a partir das interações entre as AuNPs (presentes na subfase do filme de Langmuir) e as moléculas de metaloporfirina (espalhadas na interface ar/água). Nanopartículas de ouro recobertas com sílica (Au-SHINs), com tamanhos diferentes (40 e 100 nm) e mesma espessura de recobrimento (10 nm), também foram incorporadas em filmes LB e em solução aquosa visando o efeito SEF (fluorescência amplificada em superfície). Três variáveis foram aplicadas para aumentar a fluorescência: tamanho de nanopartícula, agregação e temperatura da amostra. Resultados teóricos e experimentais mostraram que as Au-SHINs 100 nm apresentam uma intensidade de amplificação cerca de 3 vezes maior e um espalhamento 2 ordens de grandeza maior que as Au-SHINs 40 nm, levando a maiores fatores de amplificação (EF). Além disso, a agregação das Au-SHINs com eletrólito e a diminuição da temperatura da amostra também resultou em maiores EF. Visando uma aplicação ambiental, AuNPs 100 nm e Au-SHINs 100 nm recobertas com 4 nm de sílica foram aplicadas na detecção do herbicida ametrina. Soluções etanólicas com concentração de 10^{-5} mol/L em coloides de AuNPs e Au-SHINs foram detectadas via SERS. Já em cana-de-açúcar, a detecção foi possível somente com AuNPs, porém, com concentrações no intervalo de 10^{-4} a 10^{-8} mol/L, sendo $5,3 \times 10^{-8}$ mol/L o limite máximo de resíduos de ametrina permitido em produtos agrícolas. Visando uma aplicação biológica, Au-SHINs 100 nm recobertas com 10 e 4 nm de sílica foram utilizadas na fabricação de SEF e SERS *tags*, respectivamente, para detecção dos antígenos IgM e do vírus da Zika em plataformas de imunoensaio. Os limites de detecção alcançados foram de 5,0 e 12,5 ng/mL para os antígenos IgM e Zika, respectivamente. Neste último caso foi possível a distinção com antígenos da Dengue, evitando a reatividade cruzada, um entrave freqüentemente encontrado em ensaios de diagnóstico da Zika.

Abstract

The present work covers the synthesis of metallic nanoparticles with specific plasmonic properties incorporated into nanostructured thin films of target molecules, as metalloporphyrins and others. Gold nanoparticles (AuNPs 16 nm) were incorporated into Langmuir-Blodgett (LB) films of metalloporphyrin aiming the SERS effect (surface-enhanced Raman spectroscopy). AuNPs were incorporated by co-deposition, taking advantage of the interaction between the AuNPs (in the Langmuir film subphase) and the metalloporphyrin molecules (sprayed at the air/water interface). Gold shell-isolated nanoparticles (Au-SHINs), with different sizes (40 and 100 nm) and same silica shell thickness (10 nm), were also incorporated into LB films and in aqueous solution targeting the SEF effect (surface-enhanced fluorescence). Three variables were applied to increase the fluorescence: size of nanoparticle, aggregation and sample temperature. Theoretical and experimental results showed that the Au-SHINs 100 nm have an enhancement intensity about 3 times higher and a scattering 2 orders of magnitude higher than the Au-SHINs 40 nm, leading to higher enhancement factors (EF). Besides, the aggregation of Au-SHINs with electrolyte and the sample temperature decreased also resulted to higher EF. Aiming an environmental application, AuNPs 100 nm and Au-SHINs 100 nm coated with 4 nm of silica were applied to detect the herbicide ametryn. Ethanolic solution with concentration of 10^{-5} mol/L in AuNPs and Au-SHINs colloids were detected via SERS. While in sugar cane, the detection was only possible with AuNPs, however, with concentrations at the range from 10^{-4} to 10^{-8} mol/L, being 5.3×10^{-8} mol/L the maximum residual limit of ametryn allowed in agricultural products. Aiming a biological application, Au-SHINs 100 nm coated with 10 and 4 nm of silica were used in the development of SEF and SERS tags, respectively, for detecting IgM and Zika virus antigens on immunoassay platforms. The limits of detection were 5.0 and 12.5 ng/mL for IgM and Zika antigens, respectively. In the latter, it was possible the distinction with Dengue antigens, preventing the cross-reactivity, an obstacle frequently found in diagnostic assays of Zika.

Sumário

1. Apresentação da tese.....	1
1.1. Motivação	1
1.2. Objetivos.....	8
1.3. Estrutura da tese	9
2. Conceitos teóricos	10
2.1. Filmes de Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS).....	10
2.2. Microscopia de ângulo de Brewster (BAM).....	14
2.3. Nanopartículas metálicas com propriedades plasmônicas	17
2.4. Espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS)	20
2.5. Fluorescência amplificada em superfície (SEF)	27
3. Materiais e métodos	32
3.1. Materiais	32
3.2. Filmes de Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS) de ZnPPIX-DME	34
3.3. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de ZnPPIX-DME+AuNPs	37
3.4. Síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs)	38
3.5. Síntese de nanopartículas de ouro recobertas com sílica (Au-SHINs)	39
3.5.1. Nanopartículas de ouro com 40 nm de diâmetro recobertas com sílica (Au-SHINs 40 nm)	39
3.5.2. Nanopartículas de ouro com 100 nm de diâmetro recobertas com sílica (Au-SHINs 100 nm)	40
3.6. Medidas de fluorescência amplificada em superfície por nanopartículas recobertas com sílica.....	42
3.7. Medidas de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS) para detecção do herbicida ametrina.....	43
3.8. Imunoensaios de detecção baseados na fluorescência amplificada em superfície (SEF) e no espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS)	45
3.8.1. Fabricação das <i>tags</i> de fluorescência amplificada em superfície (SEF <i>tags</i>) e de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS <i>tags</i>)	45
3.8.2. Conjugação das SEF <i>tags</i> com anticorpos IgM e das SERS <i>tags</i> com anticorpos da Zika.. ..	47
3.8.3. Conjugação de anticorpos IgM e Zika NS1 em substratos	48
3.8.4. Imunoensaio SEF para detecção do antígeno IgM e SERS para detecção do antígeno do vírus da Zika	49
3.9. Técnicas de caracterização	51
4. Crescimento e caracterização de filmes de Langmuir, LB e LS de ZnPPIX-DME	55
4.1. Filmes de Langmuir	55

4.2. Crescimento dos filmes LB e LS monitorados via extinção no ultravioleta-visível (UV-Vis).....	59
4.3. Morfologia dos filmes LB e LS em escalas micro e nanométrica	64
4.4. Organização molecular dos filmes LB e LS via FTIR.....	69
5. Codeposição de AuNPs e ZnPPIX-DME via técnica de Langmuir-Blodgett (LB).....	72
5.1. Filmes de Langmuir de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs.....	72
5.2. Filmes LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs.....	77
6. Fluorescência amplificada em superfície por nanopartículas recobertas com sílica	90
6.1. Medidas de SEF em solução aquosa de CV	90
6.2. Medidas de SEF em monocamada LB mista de 15CPTCD/EA.....	96
6.3. Medidas de SEF em monocamada LB de EOSDEC.....	98
7. Aplicação ambiental: detecção de ametrina via espalhamento Raman amplificado em superfície.....	103
7.1. Medidas de SERS em solução de ametrina	103
7.2. Medidas de SERS em cana-de-açúcar.....	109
8. Aplicação biológica: imunoenaios de fluorescência amplificada em superfície e de espalhamento Raman amplificado em superfície.....	120
8.1. Imunoensaio utilizando <i>tags</i> de fluorescência amplificada em superfície (SEF <i>tags</i>) para quantificação de IgM.....	120
8.1.1. Caracterização morfológica e espectroscópica das Au-SHINs e SEF <i>tags</i>	121
8.1.2. Aplicação das SEF <i>tags</i> na quantificação do antígeno IgM.....	126
8.2. Imunoensaio utilizando <i>tags</i> de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS <i>tags</i>) para quantificação do vírus da Zika	130
8.2.1. Caracterização morfológica e espectroscópica das Au-SHINs e SERS <i>tags</i> ...	131
8.2.2. Aplicação das SERS <i>tags</i> na quantificação do antígeno da Zika	137
9. Conclusões e considerações finais	143
9.1. Conclusões.....	143
9.2. Considerações finais.....	146
Referências.....	149

Lista de figuras

Figura 1: ilustração do efeito SHINERS na detecção do pesticida metil paratiol em casca de laranja. Adaptado de Li et al. ⁷	3
Figura 2: fluorescência amplificada em superfície (SEF) ativada com AuNPs recobertas com sílica (SHINEF), as quais atuam como “poeiras inteligentes” sobre a superfície em análise (monocamada Langmuir-Blodgett neste caso). Adaptado de Guerrero e Aroca ⁸	4
Figura 3: isoterma π -A do ácido esteárico mostrando as três fases de compressão do filme de Langmuir até o colapso. O detalhe mostra um modelo de uma molécula anfifílica	11
Figura 4: ilustração dos tipos de deposição dos filmes Langmuir-Blodgett (LB).....	13
Figura 5: ilustração da deposição dos filmes Langmuir-Schaefer (LS).	14
Figura 6: esquema da luz não polarizada incidindo em uma superfície refletora formando com a normal o ângulo de Brewster (θ_p). Os raios refletidos (linearmente polarizados) e refratados são perpendiculares entre si. Adaptado de Sears, F. W. et al. ⁷⁴ e Halliday, D. et al. ⁷⁵	16
Figura 7: esquema da luz polarizada incidindo sobre uma superfície formando com a normal o ângulo de Brewster (θ_p). Neste caso não há raio refletido. Adaptado de Sears, F. W. et al. ⁷⁴ e Halliday, D. et al. ⁷⁵	17
Figura 8: propriedades ópticas de uma variedade de metais na região do visível. As componentes real (lado esquerdo) e imaginária (lado direito) da função dielétrica do metal (ϵ_{metal}) estão plotadas pelo comprimento de onda. Adaptado de Le Ru et al. ⁷⁸	19
Figura 9: (a) espectros de extinção para AgNPs nos formatos de cubo, fio e esfera. As nanopartículas em forma de fio têm 90 ± 12 nm de diâmetro, as cúbicas têm comprimento de aresta de 79 ± 12 nm e as esféricas têm 38 ± 12 nm de diâmetro. (b) Espectros de extinção para nanocubos de Ag em função do tamanho 56 ± 8 nm, 79 ± 13 nm e 129 ± 7 nm (comprimento das arestas) correspondentes aos espectros em cores laranja, vermelho e azul, respectivamente. O detalhe mostra uma fotografia das três amostras de nanocubos em suspensão de etanol. Adaptado de Linic et al. ⁸³	20
Figura 10: (a) momento de dipolo da molécula (p_1) induzido pelo laser incidente no espalhamento Raman, (b) E_{Local} ao redor das nanopartículas metálicas formado pelo campo elétrico do laser incidente (E_{Laser}) e das nanopartículas (E_p) e (c) efeito SERS - a molécula adsorvida sobre a superfície metálica é polarizada pelo E_{Local} induzindo o dipolo molecular (p_1), cuja irradiação também pode polarizar o metal, induzindo um dipolo nas nanopartículas metálicas (p_2).	22
Figura 11: ilustração de uma partícula esférica metálica com o E_{Local} estabelecido ao seu redor, sendo o dipolo p máximo para uma frequência $\omega = \omega_{\text{Laser}}$ na condição de ressonância.	23
Figura 12: interpretação do efeito SERS para uma molécula, com dipolo molecular p_1 , adsorvida sobre uma nanopartícula metálica, com dipolo p_2 , que oscila com a mesma frequência de p_1 . A frequência de vibração de p_2 , correspondente ao espalhamento Raman (ω_{Raman}), está próxima da frequência do laser ($\omega_{\text{Laser}} \sim \omega_{\text{Raman}}$), satisfazendo a condição de ressonância.	24

Figura 13: transferência de carga (CT) no complexo molécula – nanopartícula metálica. As curvas dos poços de potencial, no estado fundamental e excitado da molécula estão ilustradas bem como a banda de condução do metal. Adaptado de Aroca et al. ⁹⁷	27
Figura 14: ilustração da dependência dos efeitos SERS e SEF em função do recobrimento das nanopartículas metálicas.	29
Figura 15: estruturas moleculares da ZnPPIX-DME, CV, 15CPTCD, EOSDEC, AMT e NB. Na molécula de ZnPPIX-DME tem-se representados os carbonos meso (C_m), alfa (C_α) e beta (C_β).	34
Figura 16: parâmetros experimentais aplicados na transferência dos filmes LB e LS de ZnPPIX-DME. (a) Transferência acumulada vs. número de camada, parâmetro controlado durante a deposição de cada monocamada de filme LB. (b) Posição da barreira vs. tempo, parâmetro monitorado durante a deposição do filme LS e usado para calcular a TR ao final de cada camada depositada.	36
Figura 17: fluxograma da síntese de AuNPs com aproximadamente 16 nm de diâmetro.	38
Figura 18: fluxograma da síntese e recobrimento das Au-SHINs com aproximadamente 40 nm de diâmetro.	40
Figura 19: fluxograma da síntese e recobrimento das Au-SHINs com aproximadamente 100 nm de diâmetro.	42
Figura 20: esquema ilustrativo do procedimento experimental usado na detecção de AMT em cana-de-açúcar via SERS. <i>Inset:</i> fotografia (câmera digital) do sistema utilizado nas medidas SERS de AMT em cana-de-açúcar.....	45
Figura 21: ilustração esquemática de (a) preparação da SEF tag - pAb: Au-SHINs (~ 100 nm + 10 nm de espessura de recobrimento com sílica); Au-SHINs + uma camada fluorescente de NB; Au-SHINs + uma camada fluorescente de NB + ~ 5 nm de recobrimento final com sílica (SEF tag); e conjugação com anticorpo policlonal IgM (SEF tag – pAb). (b) Substrato conjugado com anticorpos monoclonais IgM: incubação com TEPSA para modificar a superfície do substrato com grupos COOH; imersão em NHS/EDC a fim de ativar os grupos COOH para ligarem-se aos grupos amino dos antígenos IgM; incubação com anticorpos monoclonais IgM (mAb); e incubação com leite desnatado para minimizar anticorpos adsorvidos não especificamente. (c) diferentes concentrações do antígeno IgM adicionadas nas correspondentes regiões da plataforma de imunoensaio, incubadas por 1 hora, e lavadas com tampão PBS. (d) Imunoensaio SEF: SEF tags - pAb adicionadas as respectivas regiões de imunoensaio, incubadas por 1 hora, lavadas com tampão PBS, e realização das medidas com linha de laser de excitação de 633 nm. Em cada etapa do procedimento experimental foram feitas lavagem com tampão PBS (mínimo de 3 vezes).	50
Figura 22: ilustração esquemática da (a) montagem da Zika-mAb-SERS tag: Au-SHIN (AuNP ~100 nm + 4 nm de espessura de recobrimento com sílica); Au-SHIN + uma camada de NB; Au-SHIN + NB uma camada de NB + ~ 10 nm ~ 5 nm de recobrimento final com sílica (SERS tag); conjugação com anticorpo monoclonal Zika NS1 (Zika-mAb). (b) Plataforma de imunoensaio SERS para detecção de diferentes concentrações do antígeno da Zika NS1. A plataforma é irradiada com linha de laser em 633 nm e o sinal SERRS das moléculas do NB, localizadas a uma distância muito próxima das nanopartículas de ouro (~ 4 nm, apenas uma camada ultrafina de sílica separa as AuNPs das moléculas de NB), é coletado por mapeamento de área.	51

Figura 23: (a) isoterma π -A da ZnPPIX-DME obtida na subfase de água ultrapura a temperatura ambiente (23 °C). O *inset* A é um esquema ilustrativo das moléculas de ZnPPIX-DME na interface ar/água ultrapura do filme de Langmuir e o *inset* B representa as interações π - π entre os anéis da protoporfirina. As dimensões aproximadas da molécula de ZnPPIX-DME são dadas em detalhe. (b) Isotermas π -A de ZnPPIX-DME obtidas para diferentes velocidades de compressão. O *inset* C mostra a dependência da área molecular média em 30 mN/m com a velocidade de compressão (as barras correspondem ao intervalo entre três isotermas registradas para cada velocidade de compressão). 56

Figura 24: (a) isotermas π -A de ZnPPIX-DME para 4 ciclos consecutivos de compressão-expansão. (b) Imagens de BAM registradas para diferentes estágios de compressão do filme de Langmuir (escala da barra = 500 μ m). O filme foi comprimido até uma pressão de superfície de 30 mN/m (referente a sua fase condensada) com velocidade de compressão das barreiras de 10 mm/min a temperatura ambiente (23 °C). 58

Figura 25: espectros de extinção para os filmes (a) LB e (b) LS contendo diferentes números de monocamadas de ZnPPIX-DME. Os filmes foram crescidos sobre substrato de quartzo a uma pressão de superfície constante em 30 mN/m sob subfase de água ultrapura a temperatura ambiente (23 °C). Os *insets* exibem a dependência linear da extinção em função do número de monocamadas depositadas. 60

Figura 26: espectros de extinção no UV-Vis para a solução de ZnPPIX-DME ($2,5 \times 10^{-5}$ mol/L) e os filmes LB e LS contendo 9 monocamadas. As curvas estão plotadas fora de escala no eixo y para uma comparação dos picos de extinção no comprimento de onda. 61

Figura 27: representação dos deslocamentos de energia das transições eletrônicas do estado fundamental (E_f) para os estados excitados (E_1 e E_2) para os agregados moleculares (a) J e (b) H e disposição dos momentos de dipolo dos respectivos agregados. 62

Figura 28: espectros Raman dos filmes LB e LS de ZnPPIX-DME (9 camadas cada) obtidos com linha de laser em 633 nm, potência de 10% em relação a 17 mW, 1 acumulação e tempo de aquisição de 10 s. O espectro do pó foi obtido com laser em 514,5 nm, potência de 10% em relação a 48,5 mW, e mesmas condições de acumulação e tempo. (b) Imagens ópticas (500x, escala da barra = 20 μ m) para os filmes LB e LS. 64

Figura 29: imagens topográficas de AFM em 2 e 3 dimensões para 9 camadas dos filmes (a) LB e (b) LS de ZnPPIX-DME. 67

Figura 30: imagens topográficas de AFM mostrando o perfil ao longo de um degrau feito pela remoção de material com uma agulha nos filmes (a) LB e (b) LS de ZnPPIX-DME contendo 9 camadas cada. 68

Figura 31: ilustração da direção da radiação incidente e do campo elétrico incidente nas medidas de FTIR para os modos de transmissão e reflexão, respectivamente.¹²⁸ 69

Figura 32: espectros FTIR obtidos para o pó da ZnPPIX-DME dispersa em pastilha de KBr e para os filmes (a) LB e (b) LS depositados sobre substrato de germânio (modo de transmissão) e espelho de ouro (modo de reflexão). 70

- Figura 33:** (a) imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do coloide de AuNPs preparado via redução com citrato de sódio. (b) Histograma construído a partir da imagem (a) para determinar o diâmetro médio das AuNPs..... 73
- Figura 34:** (a) isotermas π -A obtidas para subfases contendo água ultrapura ou coloide de AuNPs e para apenas a suspensão coloidal de AuNPs 16 nm na subfase (AuNPs) a temperatura ambiente (23 °C). O *inset* apresenta um esquema ilustrativo do filme de Langmuir de ZnPPIX-DME na interface ar/água contendo AuNPs na subfase. As dimensões das AuNPs foram determinadas via MET e estão de acordo com Aroca et al.¹⁰ (b) Elasticidade no plano (C_s^{-1}) calculada a partir das isotermas π -A plotadas em (a) usando a expressão: $C_s^{-1} = -A(\partial\pi/\partial A)$ 74
- Figura 35:** isotermas π -A de ZnPPIX-DME obtidas em triplicata para subfases de água ultrapura (ZnPPIX-DME) ou coloide de AuNPs (ZnPPIX-DME+AuNPs) a 23 °C. 76
- Figura 36:** espectros de extinção para o coloide de AuNPs e sua respectiva extinção de *plasmon* de superfície (518 nm) e para os filmes LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs. Os espectros dos filmes LB estão plotados em escala no eixo Y e o do coloide fora de escala. A seta vermelha corresponde a excitação Raman com linha de laser em 633 nm. 77
- Figura 37:** espectros de extinção para os filmes LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs, para o substrato de quartzo imerso em coloide de AuNPs (etapa 2: adsorção) e subsequentemente em água ultrapura (etapa 4: dessorção), para o procedimento descrito anteriormente repetido e quartzo apenas imerso e imerso em coloide de AuNPs. 79
- Figura 38:** (a) espectros RS e SERS dos filmes LB de ZnPPIX-DME (1 monocamada) e ZnPPIX-DME+AuNPs (1 camada), respectivamente. Linha de laser em 633 nm. Os *insets* apresentam imagens ópticas de ambos os filmes LB e as flechas indicam as regiões de coleta dos espectros. (b) Espectros RS da ZnPPIX-DME pó e do filme LB (9 monocamadas) com linhas de laser em 514,5 e 633 nm, respectivamente, e espectro SERS do filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs (1 camada) com laser em 633 nm. 81
- Figura 39:** estrutura molecular da ZnPPIX-DME. Os carbonos meso (C_m), alfa (C_α) e beta (C_β) estão representados na molécula bem como os grupos que as compõe. 82
- Figura 40:** imagem óptica e mapeamento SERS (sobrepastos) registrados para o filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs para uma área contendo domínios de AuNPs. Um grupo de espectros SERS coletados em diferentes regiões também está apresentado. 84
- Figura 41:** orientação proposta para as moléculas de ZnPPIX-DME adsorvidas sobre as AuNPs considerando as regras de seleção de superfície e as bandas amplificadas nos espectros SERS das famílias I e II (Figura 33). O esquema está representado fora de escala quando comparada as dimensões da AuNP (diâmetro: 16 nm) e da ZnPPIX-DME (altura: 1,5 nm e base: 1,2 nm). 86
- Figura 42:** imagens topográficas de AFM em 2 e 3 dimensões para os filmes LB de (a) ZnPPIX-DME e (b) ZnPPIX-DME+AuNPs. Para ambos os filmes apenas uma camada LB foi depositada. 87
- Figura 43:** imagens de MET das (a) Au-SHINs 40 nm com 3 horas de recobrimento (extinção de *plasmon* com máximo em 530 nm) e (b) Au-SHINs 100 nm com 6 horas de recobrimento (extinção de *plasmon* com máximo em 570 nm). 91

- Figura 44:** espectros de extinção das Au-SHINs 40 e 100 nm, com picos máximos de extinção de *plasmon* em 530 e 570 nm, respectivamente, e espectros de extinção e emissão da solução de CV (6×10^{-6} mol/L). A seta verde corresponde a linha de laser de excitação em 514,5 nm. 92
- Figura 45:** espectros de fluorescência e SEF para a solução de CV. O espectro referência é a emissão da solução de CV (6×10^{-6} mol/L) e os espectros SEF são das soluções de CV contendo Au-SHINs 40 nm (EF=29) e Au-SHINs 40 nm agregadas com adição de diferentes volumes de NaCl (0,1 mol/L): 200 μ L (EF=38), 500 μ L (EF=46) e 800 μ L (EF=53). A concentração da CV em Au-SHINs é a mesma que em água ultrapura e a linha de laser de excitação em 514,5 nm. 92
- Figura 46:** espectros de fluorescência e SEF para a solução de CV. O espectro referência é a emissão da solução de CV (6×10^{-6} mol/L) e os espectros SEF são das soluções de CV contendo Au-SHINs 100 nm (EF=47) e Au-SHINs 100 nm agregadas com adição de diferentes volumes de NaCl (0,1 mol/L): 200 μ L (EF=38), 500 μ L (EF=46) e 800 μ L (EF=155). A concentração da CV em Au-SHINs é a mesma que em água ultrapura e a linha de laser de excitação em 514,5 nm. O *inset* apresenta uma imagem de MET de uma Au-SHIN 100 nm. 93
- Figura 47:** resposta do campo próximo e intensidade de amplificação para as Au-SHINs de 40 nm e 100 nm, recobertas com uma espessura de sílica fixa em 10 nm. O *gap* entre as duas Au-SHINs (representado por x) varia de 0 a 20 nm. 94
- Figura 48:** seções transversais de espalhamento calculadas para os dímeros das Au-SHINs de 40 nm e 100 nm. O *gap* entre as duas Au-SHINs (representado por x) varia de 0 a 20 nm. 95
- Figura 49:** comparação entre campo próximo e distante para Au-SHINs de 40 nm e 100 nm, recobertas com uma espessura de sílica fixa em 10 nm. 95
- Figura 50:** espectros SEF da monocamada LB mista de 15CPTCD/AE mostrando a emissão do monômero, excitado com linha de laser em 514,5 nm e com máximo em aproximadamente 557 nm, e a emissão do excímero em 679 nm observada com linha de laser de excitação em 633 nm. As flechas verde e vermelha representam as linhas de laser em 514,5 nm e 633 nm, respectivamente. 97
- Figura 51:** isoterma π -A (pressão de superfície vs área molecular média) da monocamada de Langmuir de EOSDEC com velocidade de compressão das barreiras de 10 mm/min. 98
- Figura 52:** espectro de emissão da monocamada LB de EOSDEC dado como referência e espectro SEF obtido com Au-SHINs 100 nm a 23 °C e linha de laser em 514,5 nm. . 99
- Figura 53:** medidas de SEF (23 °C) para Au-SHINs de 100 nm espalhadas sobre a monocamada LB de EOSDEC. A excitação foi realizada com linha de laser em 514,5 nm. Os *insets* correspondem as imagens ópticas das regiões onde foram coletados os espectros SEF. 100
- Figura 54:** medidas de SEF dependente da temperatura para Au-SHINs 100 nm espalhadas sobre a monocamada LB de EOSDEC. Linha de laser em 514,5 nm. No *inset* tem-se representada a estrutura molecular da EOSDEC. 101
- Figura 55:** imagens de MET para os coloides de (a) AuNPs 100 nm e (b) Au-SHINs 100 nm recobertas com sílica por 1 hora. 103

- Figura 56:** espectros de extinção para os coloides (a) AuNPs 100 nm e (b) Au-SHINs 100 nm com 4 nm de recobrimento. Os espectros da solução de AMT e dos coloides com AMT também estão mostrados. Em todos os casos a concentração de AMT é 10^{-5} mol/L. 104
- Figura 57:** espectro Raman da AMT (pó) e espectros SERS da AMT em solução com coloide de AuNPs 100 nm (AuNPs + AMT) e Au-SHINs 100 nm recobertas com 4 nm de sílica (Au-SHINs + AMT). Nos espectros SERS a concentração final de AMT é 10^{-5} mol/L. As medidas foram realizadas com linha de laser em 633 nm e as bandas SERS de maior amplificação estão destacadas nos espectros. *Inset:* estrutura molecular da AMT. 106
- Figura 58:** representação esquemática da adsorção da AMT sobre a superfície das (a) AuNPs e (b) Au-SHINs. Em ambos os casos as moléculas de AMT adsorvem, preferencialmente, via anéis triazínicos paralelos a superfície das nanopartículas, com os grupos N–H e C–H da cadeia lateral etílica também próximos à superfície das AuNPs e Au-SHINs. O esquema está fora de escala quando comparada as dimensões das nanopartículas e da AMT. 109
- Figura 59:** espectros Raman da cana-de-açúcar (SC), cana-de-açúcar + AMT 10^{-3} mol/L em etanol (SC + AMT), cana-de-açúcar + AuNPs (SC + AuNPs) e cana-de-açúcar + Au-SHINs (SC + Au-SHINs) e espectros SERS da AMT (10^{-3} mol/L em etanol) em cana-de-açúcar após adição dos coloides AuNPs (SC + AMT + AuNPs) e Au-SHINs (SC + AMT + Au-SHINs) obtidos com linha de laser em 633 nm. A AMT foi borrifada e os coloides gotejados sobre a cana (5 μ L). 110
- Figura 60:** espectros SERS para diferentes concentrações de AMT dissolvida em etanol e borrifada em cana-de-açúcar, e posterior adição de AuNPs 100 nm (gotejamento - 5 μ L). A intensidade Raman (eixo Y) está normalizada. 113
- Figura 61:** proposta para a adsorção e orientação da AMT sobre AuNPs, nas diferentes concentrações detectadas em cana-de-açúcar, considerando as bandas amplificadas nos espectros SERS (Figura 60) e as regras de seleção de superfície SERS. O campo eletromagnético local (E_{local}) e o dipolo do modo vibracional C–S ($P_{\text{C-S}}$) também estão representados na figura. O esquema está fora de escala quando comparada as dimensões das AuNPs e da AMT. 116
- Figura 62:** espectros Raman (a) do pó da AMT (Sigma-Aldrich, sem qualquer purificação), (b) do precipitado desse mesmo pó após dispersão em água ultrapura e centrifugação (produto purificado) e (c) da subtração do espectro (a) pelo (b). (d) Espectro SERS da AMT, adquirida da Sigma-Aldrich, em cana-de-açúcar ($5,3 \times 10^{-8}$ mol/L). Para as medidas de SERS foi utilizada a AMT conforme adquirida da Sigma-Aldrich, sem nenhuma purificação prévia. Para as medidas em solução a AMT foi solubilizada em etanol e depois adicionada às soluções coloidais de AuNPs e Au-SHINs. Para as medidas em cana-de-açúcar a AMT foi solubilizada em etanol, borrifada na cana-de-açúcar, depois o coloide foi gotejado sobre essa superfície da cana, já contendo AMT, e então as medidas foram realizadas. 119
- Figura 63:** imagens de MET para as (a) AuNPs 40 nm ($40 \pm 3,4$ nm de diâmetro), (b) AuNPs 100 nm ($102 \pm 3,8$ nm de diâmetro) e (c) Au-SHINs ($102 \pm 3,8$ nm de diâmetro e $9,0 \pm 1,0$ nm de espessura de recobrimento com sílica). (d) Espectros de extinção das AuNPs 40 nm, AuNPs 100 nm e Au-SHINs, com *plasmon* de extinção máximo em 530, 570 e 577 nm, respectivamente. 121

Figura 64: validação da eficiência do recobrimento com sílica na amplificação da fluorescência. Soluções de NB contendo (a) AuNPs 100 nm e (b) Au-SHINs 100 nm com 10 nm de recobrimento. Em ambos os casos a concentração final de NB é 10^{-6} mol/L. 123

Figura 65: imagens de MET para as (a) Au-SHINs 100 nm com 10 nm de recobrimento e (b) SEF tags, mostrando o aumento na espessura da camada de sílica de $9,0 \pm 1,0$ nm para $13,4 \pm 1,4$ nm, respectivamente. (c) Espectros de extinção das Au-SHINs e SEF tags exibidas em (a) e (b), respectivamente. (d) Espectro de emissão de fluorescência para a solução de NB 10^{-6} mol/L e espectro SEF para a suspensão coloidal de SEF tags. A inserção em (d) mostra a estrutura molecular do NB. 124

Figura 66: variação da intensidade de fluorescência da suspensão coloidal de SEF tags ao longo do processo de lavagem (etapas de 1 a 5). A inserção mostra a variação na intensidade da banda de emissão em 678 nm em função do número de lavagens. 126

Figura 67: (a) respostas espectrais para um imunensaio SEF na presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno IgM e para experimentos controle “branco” e “sem antígeno IgM”. (b) – (i) Mapeamentos de área ($40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ com passo de $3 \mu\text{m}$) mostrando a distribuição do sinal SEF integrado (área da banda) para diferentes concentrações do antígeno IgM. Linha de laser = 633 nm, potência = 17 mW atenuada para 10%, lente objetiva = 50x e tempo de aquisição = 1s. 128

Figura 68: dependência linear entre resposta SEF e concentração de antígeno IgM para as concentrações de (a) 100, 50, 15 e 5 $\mu\text{g/mL}$ e (b) 500, 250, 100 e 10 ng/mL . A resposta da intensidade SEF é uma média dos espectros SEF para cada concentração de antígeno IgM e as barras de erro representam a variação espacial das respostas SEF para cada concentração de antígeno IgM. 129

Figura 69: (a) *Cartoon* da composição das Au-SHINs e SERS tags. A Au-SHIN consiste de: AuNPs com $102 \pm 8,0$ nm de diâmetro recobertas com uma espessura de sílica de $4,2 \pm 1,0$ nm; a SERS tag é formada por: Au-SHIN + uma camada ultrafina de azul do Nilo (NB) covalentemente ligada sobre a superfície da Au-SHIN + recobrimento final de sílica com espessura de $9,4 \pm 1,4$ nm, a qual é posteriormente funcionalizada com anticorpos monoclonais da Zika NS1. (b) Espectros de extinção das Au-SHINs e SERS tags com valores máximos de LSPR em 573 e 577, respectivamente. Imagens de MET das (c) Au-SHINs ($102 \pm 8,0$ nm de diâmetro e $4,2 \pm 1,0$ nm de recobrimento com sílica) e (d) SERS tags ($102 \pm 8,0$ nm de diâmetro e $9,4 \pm 1,4$ nm de recobrimento final com sílica). 131

Figura 70: Histogramas para as dimensões médias das Au-SHINs e SERS tags. No caso das Au-SHINs tem-se (a) o diâmetro médio das AuNPs + (b) a espessura do recobrimento com sílica. Já para as SERS tags as dimensões são dadas pelas dimensões das Au-SHINs + (c) a espessura do recobrimento final com sílica. Estes valores foram obtidos a partir das imagens de MET das Figuras 69c e 69d. 132

Figura 71: validação do recobrimento com sílica na amplificação do espalhamento Raman. Espectro Raman ressonante (RR) da solução de NB com concentração de 10^{-6} mol/L (linha preta) e espectros SERRS das soluções de NB contendo AuNPs (linha roxa) e Au-SHINs (linha azul), com concentrações finais de NB de 10^{-6} mol/L. Linha de laser de excitação em 633 nm. Nos *insets* tem-se representado (da esquerda para a direita): solução de NB + AuNPs e solução de NB + Au-SHINs. 134

Figura 72: espectro Raman ressonante da solução de NB 10^{-4} mol/L (linha preta) e espectros SERRS das soluções de NB contendo AuNPs (linha rosa) e Au-SHINs (linha

azul), com concentrações finais de NB de 10^{-6} mol/L, e das SERS *tags* (linha verde) e Ab-Zika-SERS *tags* (linha vermelha). Linha de laser de excitação em 633 nm. 135

Figura 73: espectros Raman dos experimentos controle “branco” e “sem antígeno Zika” e SERRS das Ab-Zika-SERS *tags*. (b) Dependência linear da resposta SERRS (médias das intensidades em 593 cm^{-1} sem tratamento matemático prévio) pela concentração de antígeno da Zika, de $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ a 10 ng/mL , e barras de erro representando os desvios padrão. Mapeamentos de área SERRS ($40\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}$, passo de $3\text{ }\mu\text{m}$) mostrando a distribuição de intensidade em 593 cm^{-1} para (c) – (l) diferentes concentrações do antígeno da Zika NS1 e (k) antígeno da Dengue NS1 ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$). Laser em 633 nm. 140

Figura 74: projeção multidimensional IDMAP para diferentes concentrações de antígeno da Zika, para uma concentração específica de antígeno da Dengue NS1 ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$) e para nenhuma concentração de antígeno da Zika (“sem antígeno Zika”). Cada círculo representa uma média das intensidades da banda em 593 cm^{-1} dentre os mapeamentos SERRS de cada concentração. Quanto mais próximos os círculos, mais similar a resposta dos mapeamentos SERRS. 141

Lista de tabelas

Tabela 1: largura à meia altura (FWHM, <i>full width at half maximum</i>) para as bandas de Soret e Q nos espectros de extinção da solução e dos filmes LB e LS de ZnPPiX-DME	64
Tabela 2: atribuições das bandas Raman da ZnPPiX-DME no pó e nos filmes LB e LS.	65
Tabela 3: rugosidade (RMS) e altura média para os filmes LB e LS de ZnPPiX-DME.	67
Tabela 4: atribuições das principais bandas FTIR da ZnPPiX-DME.....	70
Tabela 5: atribuições vibracionais para as bandas Raman características do pó de ZnPPiX-DME e do filme LB de ZnPPiX-DME+AuNPs.	83
Tabela 6: rugosidade (RMS) e altura média para os filmes LB de ZnPPiX-DME e ZnPPiX-DME+AuNPs.....	87
Tabela 7: atribuições vibracionais para as bandas Raman (pó da AMT) e SERS (AuNPs + AMT e Au-SHINs + AMT) características da AMT.	107
Tabela 8: atribuições vibracionais das bandas SERS observadas para as diferentes concentrações de AMT detectadas em cana-de-açúcar utilizando AuNPs 100 nm.....	115

Siglas

AE	ácido esteárico
AFM	microscopia de força atômica
AuNPs	nanopartículas de ouro
Au-SHINs	nanopartículas de ouro recobertas com sílica
BAM	microscopia de ângulo de Brewster
CV	cristal violeta
EOSDEC	eosina decil éster
FTIR	espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
LB	Langmuir-Blodgett
LS	Langmuir-Schaefer
LSPR	ressonância localizada de <i>plasmon</i> de superfície
MET	microscopia eletrônica de transmissão
SEF	fluorescência amplificada em superfície
SERS	espalhamento Raman amplificado em superfície
SERRS	espalhamento Raman ressonante amplificado em superfície
SHINEF	fluorescência amplificada em superfície por nanopartículas recobertas com sílica
SHINERS	espectroscopia Raman amplificado em superfície por nanopartículas recobertas com sílica
TR	taxa de transferência
ZnPPIX-DME	protoporfirina (IX) dimetil éster de zinco(II)
15CPTCD	bis(pentadecilimido) perileno
AMT	ametrina
NB	azul do Nilo

Capítulo 1

1. Apresentação da tese

1.1. Motivação

Dispositivos eletrônicos tais como células solares, dispositivos emissores de luz, transistores, cristais líquidos e sensores baseados em materiais orgânicos, organometálicos e/ou híbridos orgânico-inorgânico têm sido fabricados e aperfeiçoados. Tais materiais destacam-se por suas propriedades ópticas, elétricas e estabilidade química e térmica. Na prática, muitos dos materiais utilizados em dispositivos elétricos e ópticos são processados na forma de filmes finos. Um fator determinante para as propriedades elétricas e ópticas destes dispositivos é a arquitetura supramolecular dos filmes finos (espessura, organização molecular, morfologia e cristalinidade).^{1,2} Desta forma, a pesquisa em filmes finos requer a utilização de técnicas que permitam tanto a fabricação, com controle na arquitetura do filme em escala micro e nanométrica, quanto a caracterização destes filmes em termos de suas propriedades ópticas, elétricas e, principalmente, estruturais em nível molecular.

Dentre as técnicas aplicadas na caracterização estrutural de filmes podemos citar a espectroscopia de extinção eletrônica no ultravioleta-visível (UV-Vis) e espectroscopias vibracionais como absorção no infravermelho (FTIR) e espalhamento Raman. Esta última apresenta uma limitação no que diz respeito à caracterização de filmes ultrafinos (de monocamadas a espessuras nanométricas), devido à baixa seção de choque do espalhamento Raman. Uma forma de contornar essa limitação é a deposição dos filmes sobre superfícies metálicas rugosas, o que pode promover a amplificação do sinal Raman em até 10^6 , em média. Tal processo é denominado espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS, do inglês *surface-enhanced Raman scattering*) e o

mecanismo de amplificação do sinal é atribuído, basicamente, a amplificação do campo eletromagnético da luz que incide sobre nanopartículas metálicas de ouro (AuNPs), prata (AgNPs) e cobre (CuNPs).^{3,4} Dentre os vários tipos de substratos SERS, destacam-se principalmente a utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) e de prata (AgNPs) na forma coloidal⁵ ou em filmes finos evaporados termicamente.⁶

Li et al.⁷ desenvolveram uma metodologia inovadora envolvendo o efeito SERS, capaz de detectar uma vasta variedade de materiais com diferentes morfologias. Eles chamaram essa nova abordagem do efeito SERS de espectroscopia Raman amplificada por nanopartículas recobertas (SHINERS, do inglês *shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy*). O sinal Raman é amplificado por AuNPs com um recobrimento de sílica de 2 a 4 nm de espessura. Trata-se, de certo modo, de uma mudança de paradigma, com as nanopartículas amplificadoras sendo espalhadas sobre a superfície a ser analisada. Além disso, o recobrimento dessas nanopartículas com uma camada ultrafina de sílica permite que elas atuem como “poeiras inteligentes” (do inglês, *smart dust*) separando o material a ser investigado do contato direto com as nanopartículas amplificadoras. A grande vantagem é o uso de uma camada quimicamente inerte que protege as nanopartículas amplificadoras da superfície do material investigado. A nova abordagem foi provada pelos autores através da aplicação de nanopartículas recobertas com sílica (SHINs, do inglês *shell-isolated nanoparticles*) na detecção de resíduos do pesticida metil paratiol. As SHINs foram espalhadas sobre a superfície de laranjas contaminadas com o pesticida, sendo observadas as bandas referentes ao pesticida pelo efeito SHINERS, como ilustra a Figura 1.

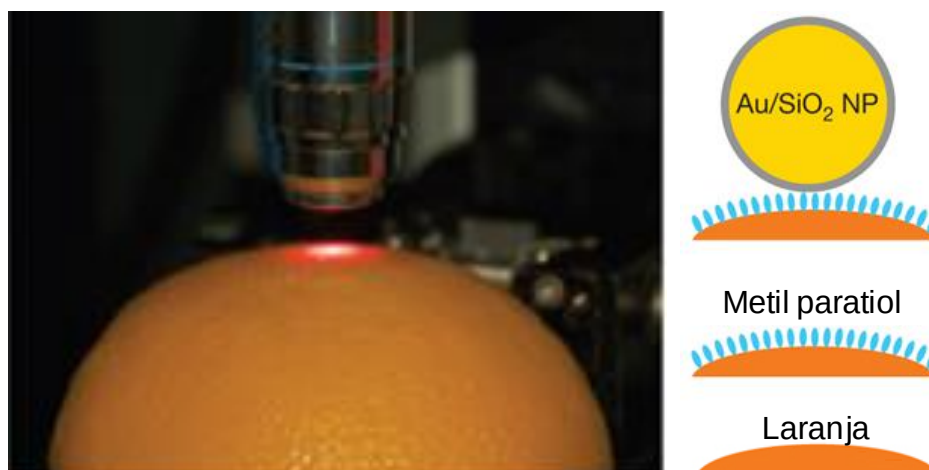


Figura 1: ilustração do efeito SHINERS na detecção do pesticida metil paratiol em casca de laranja. Adaptado de Li et al.⁷

Outra vantagem da técnica é a possibilidade de estudos de fluorescência amplificada em superfície (SEF, do inglês *surface-enhanced fluorescence*). Por um lado, se as SHINs, dependendo da espessura do recobrimento com sílica, podem deixar de atuar como amplificadores do sinal Raman (SHINERS), sendo uma desvantagem, por outro lado podem impedir a supressão da fluorescência e então atuarem como amplificadores da fluorescência, conforme reportado por Guerrero e Aroca para o efeito de fluorescência amplificada em superfície por nanopartículas recobertas com sílica (SHINEF, do inglês *shell-isolated nanoparticle enhanced fluorescence*)⁸ e ilustrado na Figura 2. Algumas variáveis, relacionadas as características das nanopartículas, são importantes no estudo do efeito de amplificação da fluorescência. Dentre as quais podemos citar: composição (ouro, prata ou cobre), tamanho e formato (nanoesferas, nanobastões, nanocubos...), além da distância cromóforo – nanopartícula que pode ser ajustada de acordo com a espessura do recobrimento com sílica.⁸

Evitaremos a troca dos acrônimos SEF por SHINEF e SERS por SHINERS quando as nanopartículas forem recobertas com sílica para minimizar o exagero de acrônimos, pois a natureza do efeito de amplificação é a mesma.

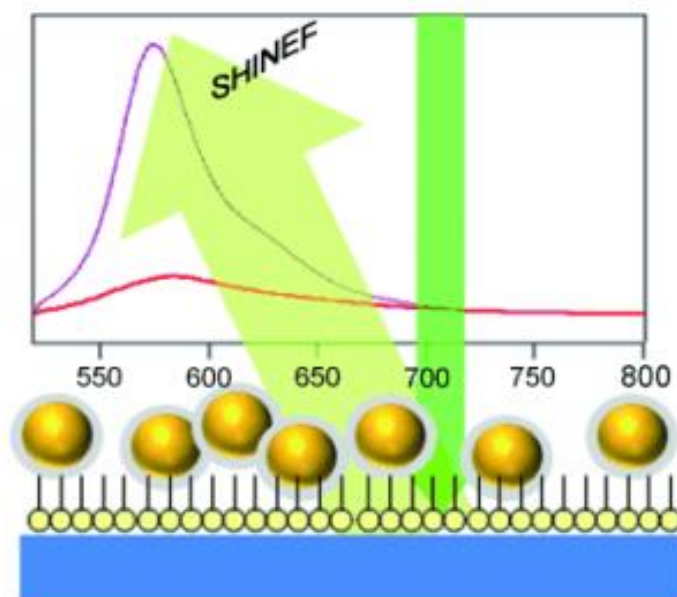


Figura 2: fluorescência amplificada em superfície (SEF) ativada com AuNPs recobertas com sílica (SHINEF), as quais atuam como “poeiras inteligentes” sobre a superfície em análise (monocamada Langmuir-Blodgett neste caso). Adaptado de Guerrero e Aroca.⁸

Este trabalho envolve a incorporação de nanopartículas metálicas com propriedades plasmônicas específicas a diferentes sistemas. Primeiramente, filmes LB e LS da protoporfirina IX dimetil éster de zinco(II) (ZnPPIX-DME) foram fabricados e caracterizados, em termos de seus arranjos supramoleculares, gerados pela estruturação dessas moléculas ao longo dos filmes. AuNPs e ZnPPIX-DME foram então codepositadas através da transferência da monocamada de Langmuir da metaloporfirina, contendo coloide de AuNPs na subfase, para um substrato sólido, formando assim um filme LB com AuNPs incorporadas na superfície. A metaloporfirina foi aplicada como molécula alvo para a obtenção do efeito SERS por pertencer a uma classe de materiais que apresentam elevada seção de choque para o espalhamento Raman,⁹ SERS e SERRS.⁸

No que se refere ao sentido inovador do tema, nos trabalhos recentemente publicados por Aroca e seus colaboradores^{8,10-12} é destacada a importância da continuidade em pesquisas envolvendo nanopartículas metálicas recobertas com sílica

com propriedades plasmônicas específicas. Como mencionado anteriormente, essas nanopartículas atuam como “poeiras inteligentes” e podem ser incorporadas a moléculas que apresentam espalhamento Raman e fluorescência, visando os efeitos de amplificação de sinal SHINERS (espessuras mais finas de recobrimento, 2 – 4 nm) e SHINEF (recobrimentos mais espessos, 5 – 20 nm), respectivamente. Nesse sentido, o trabalho abrange também a utilização de AuNPs com tamanhos de núcleo e espessuras de recobrimento com sílica ajustados para aplicação em monocamadas LB, solução aquosa, sistemas de detecção e plataformas de imunoensaio, visando os efeitos SERS e SEF. Nestes dois últimos casos as nanopartículas metálicas foram usadas em duas vertentes distintas: ambiental e biológica, respectivamente.

A técnica SERS tem sido aplicada com sucesso na detecção e monitoramento ambiental^{13–16} de alguns poluentes presentes no solo,¹⁷ em rios,¹⁸ lavouras,^{7,19} e até em água de torneira.²⁰ Suas vantagens estão relacionadas as finas bandas espectroscópicas com excelente especificidade molecular, redução do foto-bleaching, pré-tratamento simples da amostra e uma alta sensibilidade,¹⁸ sendo capaz de detectar níveis traço do analito de estudo.^{19,20} Dentre os poluentes ambientes, os pertencentes a família dos derivados triazínicos¹⁷ merecem atenção por serem comumente utilizados na produção agrícola.^{21,22} A ametrina (AMT) destaca-se devido ao seu amplo uso em culturas de cana-de-açúcar no Brasil. Trata-se de um herbicida seletivo, vastamente empregado no controle de ervas daninhas em plantações.²³ Devido à sua toxicidade (classe III, segundo classificação da Agência de Proteção Ambiental (APA)), persistência e acumulação no meio ambiente, bem como seus efeitos sobre o meio ambiente e a saúde humana, a AMT está listada como um poluente químico que precisa ser monitorado.^{24,25} O limite admissível de resíduos de AMT em produtos agrícolas como abacaxi, milho, grãos de café e cana-de-açúcar, regulamentado em alguns países e

aplicado pela ANVISA, é de 0,05 mg/kg (0,05 mg de AMT por kg de produto).²⁶ Dessa forma, a utilização de técnicas ultrasensíveis, como o SERS, capazes de detectar baixas concentrações de herbicida em produtos agrícolas brutos, como na superfície de frutas, verduras, grãos, entre outros, é de grande relevância.

Plataformas de imunoensaio baseadas nos efeitos de amplificação do sinal da fluorescência (SEF)^{27,28} e Raman (SERS)²⁹⁻³¹ têm sido desenvolvidas com o intuito de aperfeiçoar os ensaios biológicos até então aplicados na quantificação de antígenos e/ou anticorpos relacionados à algumas doenças. Métodos baseados na fluorescência são amplamente usados em imunoensaios.³²⁻³⁴ No entanto, apesar de sua grande aprovação e popularidade, alguns marcadores fluorescentes comuns têm desvantagens em termos de eficiência de emissão, particularmente para determinação de baixas concentrações de analito.³⁵ Dessa forma, há uma busca contínua por marcadores mais sensíveis e estáveis a fim de melhorar o desempenho de imunoensaios baseados na fluorescência.

O advento de diferentes classes de materiais nanoestruturados vem fornecendo alternativas interessantes para corantes orgânicos aplicados em métodos analíticos ópticos.^{36,37} As SHINs representam uma nova geração de nanomateriais usados para amplificação espectroscópica. Seu conceito pode ser estendido para o *design* de marcadores eficientes baseados na espectroscopia de fluorescência, aparecendo como plataformas ideais para promover o efeito SEF^{8,10-12} desde que a distância entre molécula emissora – nanoestrutura metálica pode ser facilmente controlada ajustando a espessura do recobrimento com sílica.⁸

O efeito SERS tem sido explorado com sucesso em variadas aplicações analíticas e biomédicas.³⁸⁻⁴² Mais especificamente, imunoensaios baseados nesse efeito vêm sendo desenvolvidos para a detecção de antígenos por apresentarem alta sensibilidade e especificidade.⁴³ O aumento do sinal surge nas proximidades da

molécula responsável pelo sinal Raman devido ao intenso campo plasmônico localizado, criado pelas nanoestruturas metálicas.^{44,45} Marcadores preparados a partir das SHINs⁷ são ideais para o desenvolvimento de imunoenaios baseados no efeito SERS, uma vez que o recobrimento ultrafino com sílica (2 – 4 nm)⁴⁶ previne a agregação das nanopartículas e possibilita modificações químicas futuras na superfície das nanopartículas, tal como a funcionalização.⁷

Anticorpos IgM são os primeiros anticorpos a serem recrutados pelo nosso organismo para lidar com novas infecções. Ensaio biológico baseado na quantificação de IgM podem ser então extremamente úteis para o diagnóstico em fase inicial de doenças infecciosas, tais como dengue e Zika.³³ O vírus da Zika é um *flavivírus* que pertence a mesma família da dengue, febre amarela e Chikungunya.^{47,48} O primeiro caso clínico foi reportado no Brasil em 2015,⁴⁹ e desde então o vírus tem se espalhado pelas Américas,⁵⁰ sendo declarado como surto pela Organização Mundial da Saúde (OMS).⁴⁹ A OMS também alertou sobre a associação da infecção por Zika e síndromes neurológicas de malformação congênita⁵¹ e estabeleceu uma correlação definitiva entre o número crescente de casos de microcefalia em recém-nascidos e a febre da Zika.⁵² A não especificidade dos sintomas agrava ainda mais o surto, dificultando o diagnóstico clínico de infecções por Zika.⁵³ Além disso, os baixos níveis de antígenos da Zika no sangue humano também representa um desafio para os métodos de diagnóstico convencionais baseados em imunoenaios.³² A reatividade cruzada de antígenos específicos da Zika com outros *flavivírus* aumenta altamente os falsos positivos, sendo assim necessário métodos de diagnóstico mais precisos, a fim de aumentar a sensibilidade e evitar a reatividade cruzada, especialmente entre Zika e Dengue.

1.2. Objetivos

Esta tese visa contribuir para o aperfeiçoamento de técnicas espectroscópicas amplificadas em superfície (SERS e SEF), abrangendo a síntese de nanopartículas metálicas com propriedades plasmônicas específicas a serem incorporadas a filmes finos nanoestruturados e soluções aquosas de moléculas de interesse, como metaloporfirinas e outras. Desta forma, os objetivos específicos foram:

- i) Fabricar filmes contendo monocamadas e multicamadas Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS) da ZnPPIX-DME, controlando a cinética de crescimento e o próprio crescimento via espectroscopia de extinção no UV-Vis e microbalança de cristal de quartzo (QCM).
- ii) Caracterizar os filmes via técnicas espectroscópicas como FTIR, espalhamento Raman e fluorescência. Utilizar também técnicas de microscopia para avaliar a morfologia dos filmes, tais como microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM).
- iii) Sintetizar AuNPs com propriedades plasmônicas específicas, avaliando parâmetros como tamanho de nanopartícula (núcleo) e espessura de recobrimento com sílica, para posterior incorporação em sistemas diversos, visando otimizar os efeitos SERS, SERRS e SEF.
- iv) Aplicar as AuNPs com diferentes espessuras de recobrimento com sílica em plataformas de imunoensaio para detecção de antígenos, fazendo uso das técnicas de amplificação SERS e SEF.
- v) Aplicar as nanopartículas metálicas diretamente na observação dos efeitos SEF, SERS e SERRS na detecção de resíduos contaminantes, como por exemplo, pesticidas presentes na casca de frutas e legumes, que estejam em concentrações muito baixas a ponto de não serem identificados por técnicas convencionais de espalhamento Raman e fluorescência.

1.3. Estrutura da tese

Essa tese está estruturada em nove capítulos, sendo o capítulo 1 a apresentação da tese, o capítulo 2 os conceitos teóricos e o capítulo 3 os materiais e métodos. A discussão dos resultados é realizada nos capítulos 4, 5, 6, 7 e 8. O capítulo 4 aborda a fabricação de filmes nanoestruturados da metaloporfirina ZnPPiX-DME via técnicas LB e LS. Neste capítulo o enfoque maior é dado para a caracterização dos arranjos supramoleculares obtidos pelas técnicas LB e LS. O capítulo 5 apresenta uma estratégia para a codeposição de AuNPs e metaloporfirina via técnica LB para obtenção do efeito SERS. Este capítulo trata da deposição das AuNPs e ZnPPiX-DME em uma única etapa a partir da transferência do filme de Langmuir de ZnPPiX-DME contendo coloide de AuNPs em subfase para o substrato, formando assim o filme LB codepositado. No capítulo 6 foi explorado o efeito SEF a partir da incorporação de AuNPs com diferentes tamanhos de núcleo e mesma espessura de recobrimento com sílica, a monocamadas LB e solução aquosa de moléculas de interesse. Nesta seção são relatados altos fatores de amplificação para o efeito SEF obtidos graças a um maior acoplamento do plasmon de extinção das Au-SHINs com a emissão de fluorescência. Por fim, no que se refere as aplicações das distintas arquiteturas das AuNPs com tamanhos e espessuras de recobrimento com sílica variados, duas vertentes são apresentadas nos capítulos 7 e 8. A primeira vertente, explorada no capítulo 7, trata de uma aplicação ambiental onde AuNPs 100 nm e Au-SHINs 100 nm recobertas com 4 nm de sílica foram utilizadas na detecção do herbicida ametrina (AMT) em solução etanólica e em cana-de-açúcar através do efeito SERS. A segunda, apresentada no capítulo 8, aborda uma aplicação biológica onde duas plataformas de imunoensaio distintas baseadas nos efeitos SEF e SERS foram desenvolvidas e aplicadas na detecção dos antígenos IgM e do vírus da Zika, respectivamente. As conclusões e as considerações finais são contempladas no capítulo 9.

Capítulo 2

2. Conceitos teóricos

2.1. Filmes de Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS)

No início do século XX Irving Langmuir, trabalhando nos laboratórios da *General Electric* (Estados Unidos), juntou dados experimentais e teóricos a respeito de importantes características e propriedades de filmes monomoleculares. Tais estudos deram início à área de filmes de Langmuir.^{54,55} Filmes de Langmuir são filmes ultrafinos (monomoleculares) e insolúveis em água formados por moléculas que apresentam um equilíbrio entre os grupos hidrofílico e hidrofóbico.⁵⁴ Os grupos hidrofílicos permitem o espalhamento das moléculas na superfície da água, enquanto os grupos hidrofóbicos não permitem que as moléculas sejam imersas na água.⁵⁶ Basicamente, uma solução contendo um material dissolvido em solvente orgânico altamente volátil é espalhada sobre subfase de água ultrapura e, após a evaporação do solvente, as moléculas do material são comprimidas por barreiras móveis formando uma monocamada na interface ar/água ultrapura, denominada filme de Langmuir. A caracterização básica dos filmes de Langmuir é realizada na forma de isotermas de pressão de superfície vs área molecular média (π -A) utilizando um sensor de Wilhelmy.⁵⁷ O sensor de pressão de superfície (Wilhelmy) é posicionado perpendicularmente ao movimento das barreiras, sendo a pressão de superfície definida pela diferença na tensão superficial da água ultrapura, com e sem a presença do filme de Langmuir na interface ar/água ultrapura.⁵⁸ Três fases distintas caracterizam a compressão do filme: fase gasosa, na qual as moléculas não interagem entre si; fase líquida, em que as moléculas já apresentam uma interação, e a fase condensada, com as moléculas dispostas formando um filme de espessura monomolecular. Quando o filme é

comprimido além deste ponto, as moléculas podem agrupar-se desordenadamente umas sobre as outras atingindo a região de colapso, como ocorre para moléculas tipicamente anfifílicas, como o ácido esteárico (Figura 3). No caso de moléculas mais complexas, como ligninas,^{59–61} polímeros^{62,63} e porfirinas,^{64–66} o agrupamento das moléculas ocorre de modo mais organizado, estruturando-se em multicamadas. O arranjo regular de moléculas orientadas na interface ar/água é característico de compostos simples, como os ácidos graxos. Moléculas maiores e mais complexas nem sempre têm as três fases identificadas de forma bem distintas.

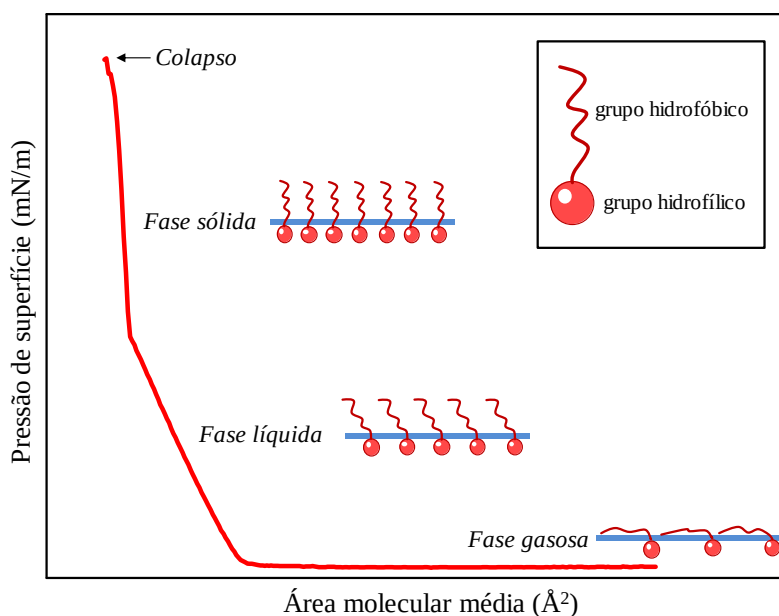


Figura 3: isoterma π -A do ácido esteárico mostrando as três fases de compressão do filme de Langmuir até o colapso. O detalhe mostra um modelo de uma molécula anfifílica

Na década de 1930 a técnica de fabricação de filmes de Langmuir foi aperfeiçoada pela assistente de Irving Langmuir, Katharine Blodgett,⁶⁷ permitindo dessa forma a deposição sucessiva de monocamadas sobre um mesmo substrato sólido. Em homenagem aos dois cientistas, tais filmes foram nomeados como filmes Langmuir-Blodgett (LB). As principais características desses filmes são a alta precisão de

espessura, que pode ser controlada até a ordem de angstroms, o elevado ordenamento molecular e a uniformidade da superfície.^{56,68}

Filmes de Langmuir-Blodgett (LB) são depositados por imersão e/ou emersão de um substrato na posição vertical, com velocidade controlada por um braço mecânico (*dipper*), mantendo-se constante a pressão de superfície em um valor correspondente a fase condensada do filme.⁶⁷ A qualidade do filme depositado pode ser monitorada pela taxa de transferência (TR, do inglês *transfer ratio*), definida pela relação entre a área de filme removido da interface ar/água ultrapura e a área recoberta do substrato. O ideal é que a cada deposição a TR seja próxima de 1,0, garantindo assim que todo o filme removido da interface ar/água ultrapura está recobrindo o substrato. O movimento do braço mecânico responsável pela imersão e emersão do substrato da subfase é dividido em iguais intervalos de tempo, determinados pelo pesquisador. A TR é dada pelo valor médio da transferência em cada intervalo e é calculada por um programa computacional durante a fabricação do filme LB. Apesar do gráfico ser apresentado na tela do computador ao longo da deposição, o valor médio só pode ser registrado ao final de cada camada depositada, o que não permite ao pesquisador atuar durante a deposição para mantê-lo próximo do valor desejado. Portanto, só o valor da TR não é suficiente para garantir uma transferência homogênea, pois pode-se depositar mais filme em uma determinada região do substrato e menos em outra, mas na média tem-se um valor de $TR \sim 1$. Para tanto, outros parâmetros são acompanhados, como a transferência acumulada⁶⁹ (do inglês *cumulative transfer*), dada pela razão entre a área varrida pelas barreiras e a área de substrato utilizada na deposição. Porém, neste caso o cálculo é executado e apresentado na tela do computador em tempo real, permitindo ao pesquisador a possibilidade de mantê-lo próximo do valor unitário variando parâmetros como a velocidade do braço mecânico. Tal parâmetro pode ser otimizado: valores

maiores tendem a induzir uma menor taxa de transferência e vice-versa. Porém, estas variações devem ser feitas de forma adequada, principalmente o aumento de velocidade, pois pode levar a uma queda irreversível da taxa de transferência e aí se perde a deposição e o experimento todo.

De acordo com a forma de deposição três tipos de filmes LB podem ser obtidos: filmes tipo X, Y ou Z (Figura 4). O tipo Y implica na deposição das camadas durante as imersões e emersões do substrato. No tipo Z as camadas são depositadas somente nas emersões do substrato, enquanto que no tipo X as camadas são depositadas somente nas imersões.⁵⁸

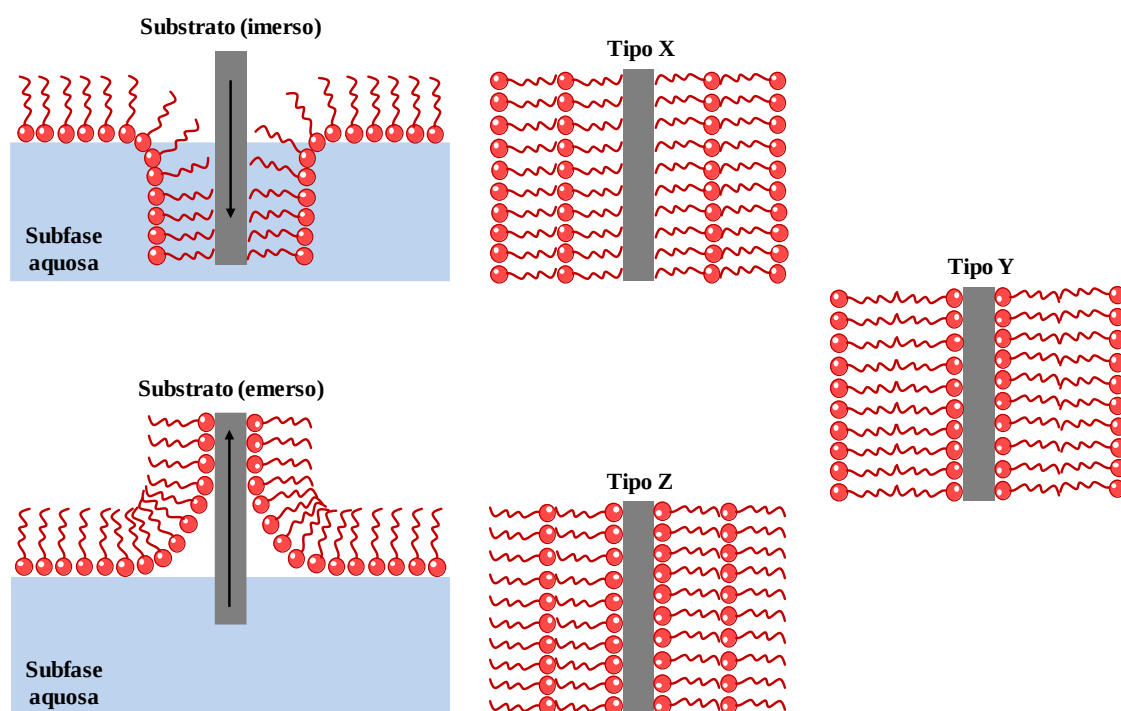


Figura 4: ilustração dos tipos de deposição dos filmes Langmuir-Blodgett (LB).

Filmes de Langmuir-Schaefer (LS) são depositados por aproximação mecânica ou manual de um substrato na posição horizontal da interface ar/água ultrapura, mantendo-se constante a pressão de superfície em um valor correspondente a fase condensada do filme (Figura 5). Neste caso não é possível controlar a transferência acumulada à medida que as monocamadas são transferidas para o substrato, como no caso do filme

LB, pois toda a camada é depositada ao mesmo tempo. O que fazemos é acompanhar a variação na posição da barreira e calcular posteriormente, ao final de cada camada LS depositada, a TR considerando a razão da área varrida pela barreira para manter a pressão de superfície constante (em virtude da remoção de filme de Langmuir da interface ar/água ultrapura) pela área recoberta do substrato.^{70,71}

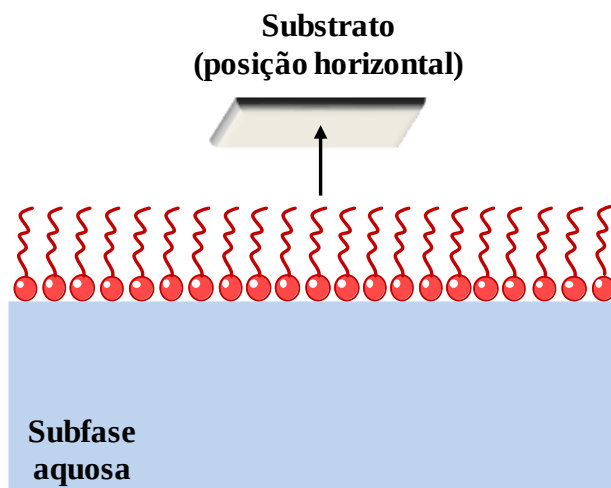


Figura 5: ilustração da deposição dos filmes Langmuir-Schaefer (LS).

2.2. Microscopia de ângulo de Brewster (BAM)

A microscopia de ângulo de Brewster pode ser utilizada para analisar filmes de Langmuir (interface ar/água ultrapura) gerando informações sobre a morfologia em escala micrométrica.⁷² O cientista inglês David Brewster em 1812 reportou que um raio de luz não polarizado, quando incide em uma superfície com um determinado ângulo de incidência (θ_p), gera um raio refletido é polarizado.⁷³ Observa-se que o ângulo refletido (denominado ângulo de Brewster) é aquele para os quais os raios refletidos e refratados são perpendiculares entre si.^{74,75} Na Figura 6 tem-se uma ilustração do ângulo de Brewster.

O tratamento físico deste problema é apresentado abaixo:

- ângulo de Brewster: θ_p
- ângulo de refração: θ_2

- índice de refração do meio 1: n_1
- índice de refração do meio 2: n_2

Os raios refratados e refletidos são perpendiculares, logo: $\theta_p + 90 + \theta_2 = 180$ e, portanto: $\theta_2 = 90 - \theta_p$ (lembrando que o ângulo de incidência é igual ao ângulo de reflexão, ambos medidos em relação à normal).

De acordo com a lei da refração:

$$\frac{\sin \theta_p}{\sin \theta_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

$$\frac{\sin \theta_p}{\sin(90 - \theta_p)} = \frac{n_2}{n_1}$$

$$\text{Sendo } \sin(a - b) = \sin a \cos b - \sin b \cos a$$

$$\frac{\sin \theta_p}{\cos \theta_p} = \frac{n_2}{n_1}$$

Portanto, o ângulo de Brewster é conhecido pela relação:

$$\tan \theta_p = \frac{n_2}{n_1}$$

Tal expressão relaciona o ângulo de Brewster com a superfície de separação entre dois meios de propagação da luz (n_1 e n_2).

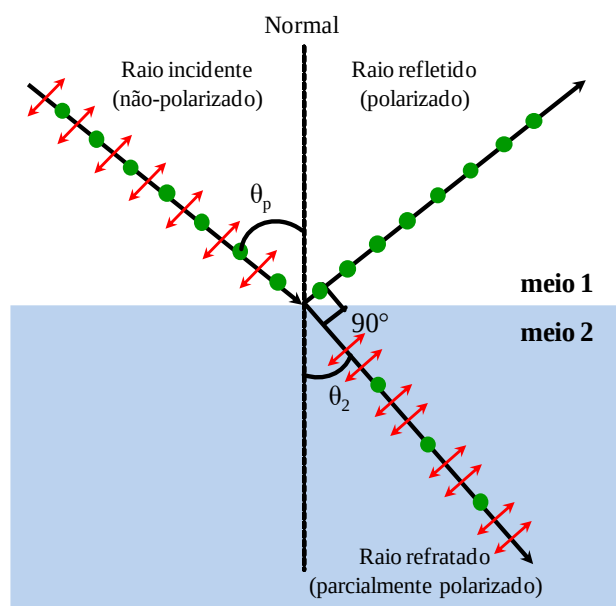


Figura 6: esquema da luz não polarizada incidindo em uma superfície refletora formando com a normal o ângulo de Brewster (θ_p). Os raios refletidos (linearmente polarizados) e refratados são perpendiculares entre si. Adaptado de Sears, F. W. et al.⁷⁴ e Halliday, D. et al.⁷⁵

As medidas de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) são realizadas considerando os índices de refração n_1 e n_2 do ar e da água, respectivamente, uma vez que tais medidas são feitas na cuba de Langmuir onde a interface é ar/água ultrapura. Desta forma, temos que o ângulo de Brewster é:

$$\tan \theta_p = \frac{1,33}{1,00}$$

$$\therefore \theta_p = 53^\circ$$

Na Figura 7 tem-se uma ilustração da microscopia de ângulo de Brewster.

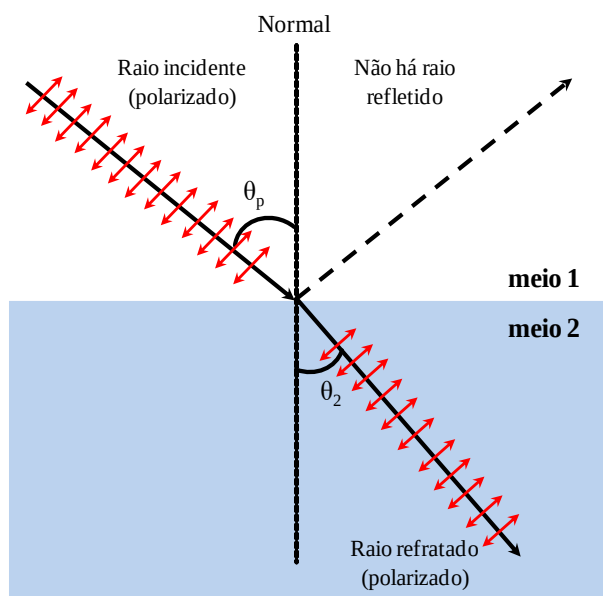


Figura 7: esquema da luz polarizada incidindo sobre uma superfície formando com a normal o ângulo de Brewster (θ_p). Neste caso não há raio refletido. Adaptado de Sears, F. W. et al.⁷⁴ e Halliday, D. et al.⁷⁵

Na prática, para as medidas de BAM, o ângulo entre o raio incidente e a normal continua sendo θ_p (ângulo de Brewster), mas neste caso o raio incidente já é polarizado justamente na direção que não resulta em luz polarizada no raio refletido representado na Figura 6. Desta forma, não há raio refletido, não sendo possível observar uma imagem na interface da cuba de Langmuir (a tela do computador fica toda escura). Por outro lado, quando um material está presente na interface da cuba de Langmuir (filme de Langmuir), o índice de refração do meio 2 é alterado e a condição estabelecida para o ângulo de Brewster não é mais satisfeita. Desta forma, podemos observar uma imagem proveniente do raio refletido quando a luz incide no material presente na interface (a tela do computador continua escura onde a interface é ar/água ultrapura, porém fica clara onde é ar/filme).

2.3. Nanopartículas metálicas com propriedades plasmônicas

O conceito de *plasmons* foi explicado pela teoria de Mie em 1908, onde ele resolveu as equações de Maxwell para partículas homogêneas esféricas com uma onda

monocromática plana, descrevendo assim o espectro de extinção (absorção + espalhamento) de partículas metálicas. Quando uma nanopartícula metálica esférica, muito menor que o comprimento de onda da radiação incidente, é irradiada por uma onda monocromática plana, o campo elétrico oscilante conduz a uma oscilação coerente dos elétrons na banda de condução.⁷⁶ Esta oscilação coletiva da nuvem eletrônica do metal excitado pela radiação incidente é chamada de ressonância de *plasmon* de superfície localizado (LSPR, do inglês *localized surface plasmon resonances*), geralmente conhecida como *plasmons*.^{4,77,78}

Os *plasmons* são radiativos, ou seja, eles espalham a luz incidente para a vizinhança. A quantidade de luz espalhada é uma propriedade do comprimento de onda da luz incidente (expressa como frequência angular, ω) e da natureza do material, dada pela função dielétrica do metal (ϵ_{metal}):^{76,77}

$$\epsilon_{\text{metal}}(\omega) = \epsilon'(\omega) + i\epsilon''(\omega) \quad (1)$$

onde $\epsilon'(\omega)$ e $i\epsilon''(\omega)$ são as componentes real e imaginária, respectivamente, da função dielétrica.

O campo elétrico incidente (E_{Laser}) induzirá um campo elétrico local (E_{Local}), que por sua vez irá depender do formato e do tamanho da nanopartícula, da função dielétrica do metal e do meio ao redor das nanopartículas, sendo ambos dependentes do comprimento de onda da luz:^{76,77}

$$E_{\text{Local}} \propto \frac{\epsilon_{\text{metal}}(\omega) - \epsilon_{\text{meio}}(\omega)}{\epsilon_{\text{metal}}(\omega) + 2\epsilon_{\text{meio}}(\omega)} \quad (2)$$

onde ϵ_{metal} é a função dielétrica do metal e ϵ_{meio} é a função dielétrica do meio ao redor das nanopartículas. Dessa forma, podemos deduzir que o campo elétrico é máximo (ou seja, tem-se o melhor espalhamento das nanopartículas) quando a seguinte condição de ressonância é estabelecida:^{76,77}

$$\text{Re}[\epsilon_{\text{metal}}(\omega)] \approx -2\epsilon_{\text{meio}} \text{ e } \text{Im}[\epsilon_{\text{metal}}(\omega)] < 1 \quad (3)$$

Nanopartículas de prata (AgNPs), ouro (AuNPs) e cobre (CuNPs) e seus respectivos agregados atendem essa condição de ressonância e, portanto, podem conter *plasmons* de superfície localizados em regiões menores que o comprimento de onda da radiação incidente. Isto permite uma alta concentração de energia eletromagnética, gerando um intenso campo eletromagnético na região do visível, chamadas de *hot spots*.^{79,80}

A Figura 8 apresenta uma comparação das propriedades ópticas (partes real e imaginária das funções dielétricas) de vários metais, sendo possível observar as condições de ressonância para os metais prata (Ag), ouro (Au) e cobre (Cu).

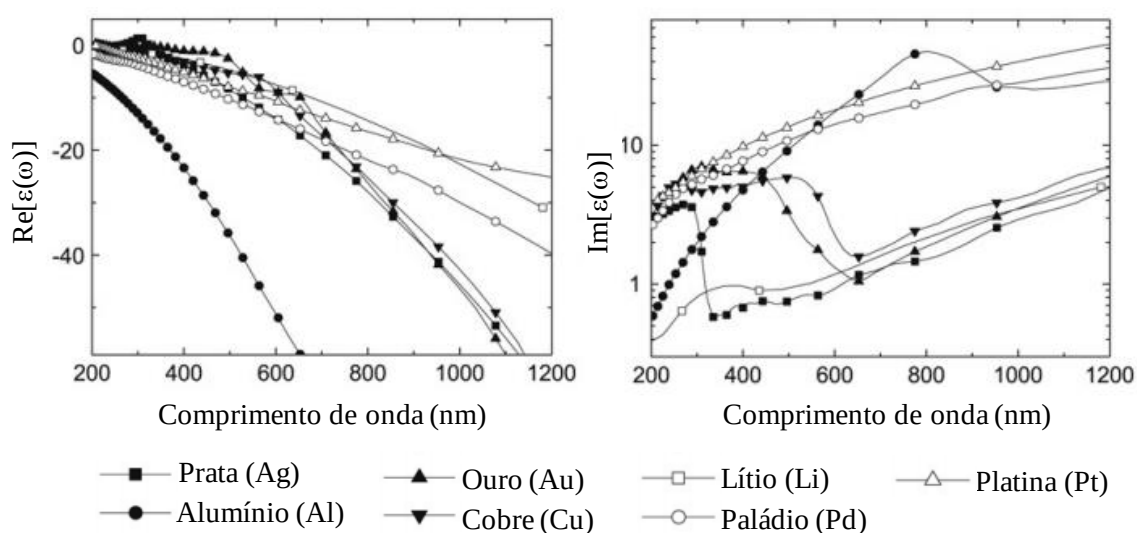


Figura 8: propriedades ópticas de uma variedade de metais na região do visível. As componentes real (lado esquerdo) e imaginária (lado direito) da função dielétrica do metal (ϵ_{metal}) estão plotadas pelo comprimento de onda. Adaptado de Le Ru et al.⁷⁸

As propriedades ópticas das nanopartículas metálicas, mais especificamente a posição do *plasmon* de absorção, são dependentes da função dielétrica do metal.⁸¹ O trabalho original de Mie considera uma nanopartícula esférica como solução exata,⁷⁶ mas na realidade nanopartículas podem diferir no formato, tamanho e agregação, causando variações na absorção e no espalhamento.⁸¹ Desta forma, formato e tamanho são características que também determinam suas propriedades ópticas,⁸² como pode ser visto na Figura 9, retirada de um artigo de Linic et al.⁸³ publicado na revista Nature

Nanomaterial. Portanto, a fabricação de nanopartículas metálicas de diferentes formatos e tamanhos possibilita o ajuste da posição do *plasmon* de absorção e, conseqüentemente, do espalhamento, de acordo com o propósito desejado. No caso dos efeitos SERS e/ou SEF isto significa sincronizar a posição do *plasmon* de absorção com a frequência angular do laser utilizado nas medidas.

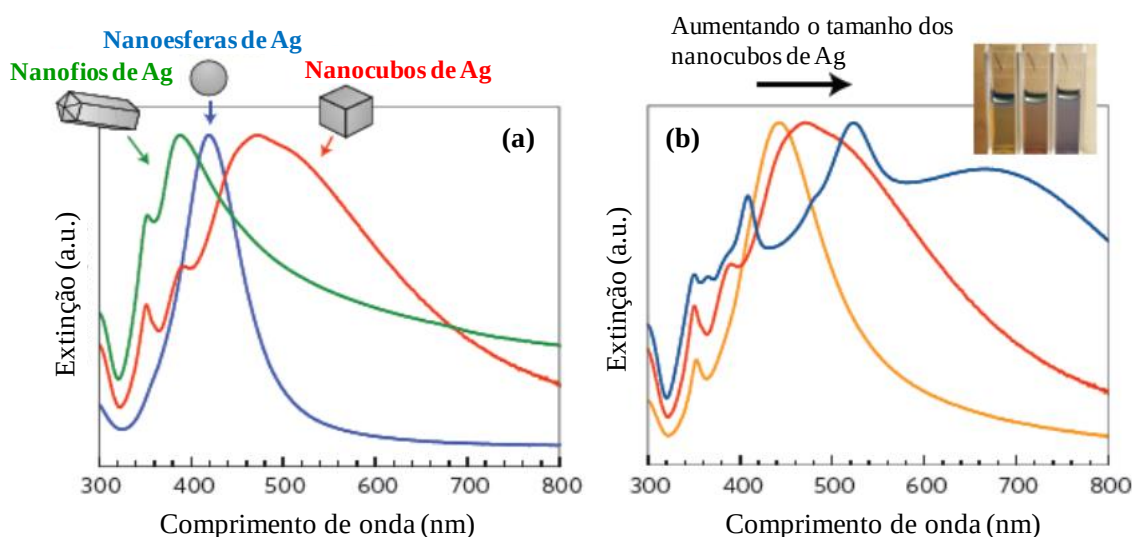


Figura 9: (a) espectros de extinção para AgNPs nos formatos de cubo, fio e esfera. As nanopartículas em forma de fio têm 90 ± 12 nm de diâmetro, as cúbicas têm comprimento de aresta de 79 ± 12 nm e as esféricas têm 38 ± 12 nm de diâmetro. (b) Espectros de extinção para nanocubos de Ag em função do tamanho 56 ± 8 nm, 79 ± 13 nm e 129 ± 7 nm (comprimento das arestas) correspondentes aos espectros em cores laranja, vermelho e azul, respectivamente. O detalhe mostra uma fotografia das três amostras de nanocubos em suspensão de etanol. Adaptado de Linic et al.⁸³

2.4. Espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS)

A amplificação do sinal Raman foi reportado pela primeira vez em 1974 por Fleischmann et al.⁸⁴ quando utilizava a espectroscopia Raman para entender as reações eletroquímicas da piridina em eletrodos rugosos de Ag. Observou-se que por este processo podia-se alcançar uma amplificação do sinal espalhado pela modificação apropriada de superfícies metálicas. Este efeito foi interpretado em 1977 por Jeanmaire e Van Duyne⁸⁵ e Albrecht e Creighton⁸⁶ em estudos independentes. O mecanismo de amplificação do sinal Raman, denominado espalhamento Raman amplificado em

superfície (SERS, do inglês *surface-enhanced Raman scattering*), envolve a excitação de *plasmons* de superfície em nanoestruturas metálicas, resultando na amplificação do campo eletromagnético (EM).⁸⁷ O campo EM amplificado é experimentado por moléculas na vizinhança das nanoestruturas⁸⁸ e induzido em nanoestruturas metálicas a partir das ressonâncias de *plasmon* de superfície localizado (LSPR), as quais incluem Au, Ag e Cu.^{4,77,78,89}

A interação entre o laser incidente, as nanoestruturas metálicas (neste caso representada por nanopartículas metálicas) e a molécula adsorvida (molécula “alvo”) e sua relação com o efeito de amplificação do sinal Raman, SERS, estão ilustradas na Figura 10. Basicamente, o acoplamento do campo elétrico do laser incidente (E_{Laser} – Figura 10a) com o campo elétrico das nanopartículas metálicas (E_P – Figura 10b) compõe o campo elétrico local (E_{Local}) ao redor das nanopartículas. As duas componentes do E_{Local} influenciam diretamente na magnitude do momento de dipolo induzido da molécula (p_1) adsorvida sobre a superfície das nanopartículas (Figura 10c). Ou seja, quando a molécula “alvo” é adsorvida sobre a superfície metálica, o E_{Local} polariza-a induzindo um momento de dipolo (p_1). O campo elétrico irradiado por este dipolo molecular induzido (p_1) também pode polarizar a superfície metálica, induzindo um dipolo nas nanopartículas (p_2) que oscila com a mesma frequência do dipolo molecular induzido (p_1).^{3,4,78}

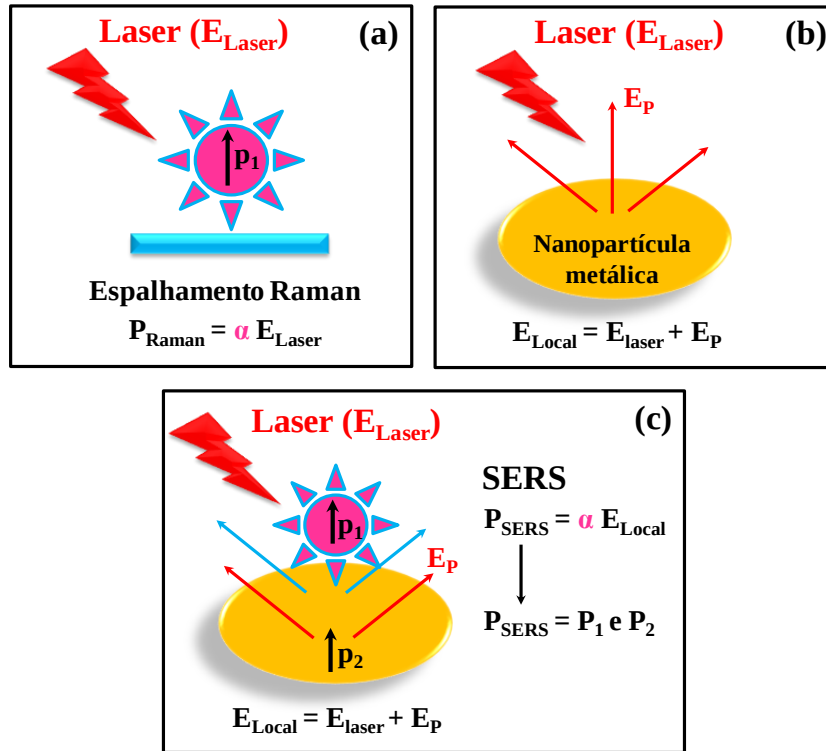


Figura 10: (a) momento de dipolo da molécula (p_1) induzido pelo laser incidente no espalhamento Raman, (b) E_{Local} ao redor das nanopartículas metálicas formado pelo campo elétrico do laser incidente (E_{Laser}) e das nanopartículas (E_p) e (c) efeito SERS - a molécula adsorvida sobre a superfície metálica é polarizada pelo E_{Local} induzindo o dipolo molecular (p_1), cuja irradiação também pode polarizar o metal, induzindo um dipolo nas nanopartículas metálicas (p_2).

O processo de amplificação do campo elétrico ao redor das nanopartículas metálicas, ou seja, o $E(p)$, pode ser compreendido através de um modelo simples de uma esfera metálica, como demonstrado na Figura 11. Este modelo assume um raio esférico (r) menor que o comprimento de onda da radiação incidente (λ), onde o campo elétrico pode ser considerado uniforme através da nanopartícula e o *plasmon* de superfície como um dipolo oscilante no centro da esfera (p). Neste caso, a intensidade do p é dada pela relação representada na equação a seguir, sendo o ϵ_{metal} a função dielétrica do metal, que é função da frequência (ω), o ϵ_{meio} a constante dielétrica do meio em torno da superfície metálica e E_{Laser} o campo elétrico da radiação incidente que oscila com uma frequência ω_{Laser} .^{3,4,78}

$$p(\omega_{Laser}) = \epsilon_{meio} \frac{\epsilon_{metal} - \epsilon_{meio}}{\epsilon_{metal} + 2\epsilon_{meio}} 4\pi r^3 E_{Laser} \quad (4)$$

O dipolo $\mathbf{p}$ é máximo para uma frequência $\omega = \omega_{Laser}$ na condição de ressonância, satisfeita para frequências na região do visível pelos metais nobres Au, Ag e Cu, como já detalhado no item 2.2.

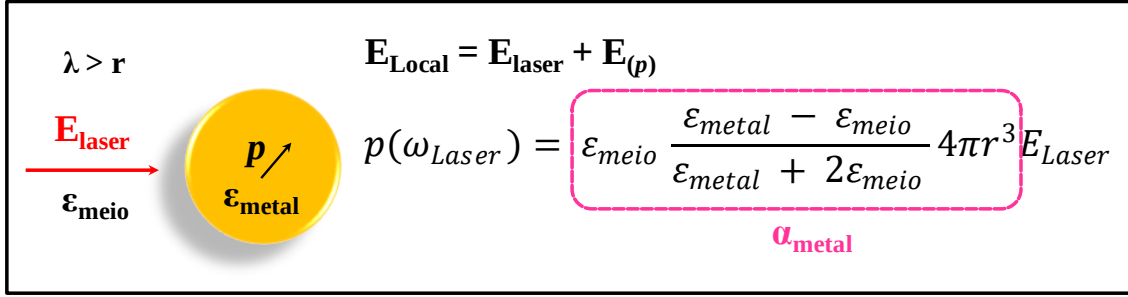


Figura 11: ilustração de uma partícula esférica metálica com o $\mathbf{E}_{Local}$ estabelecido ao seu redor, sendo o dipolo $\mathbf{p}$ máximo para uma frequência $\omega = \omega_{Laser}$ na condição de ressonância.

A interpretação do efeito SERS pode ser realizada utilizando a equação (4), porém substituindo o $\mathbf{p}$ por $\mathbf{p}_2$, como demonstrado na Figura 12. O dipolo $\mathbf{p}_2$, induzido na nanopartícula metálica, que oscila com a mesma frequência do dipolo molecular induzido $\mathbf{p}_1$, também pode ser maximizado, assim como $\mathbf{p}$. Tal efeito ocorre porque a frequência de vibração de $\mathbf{p}_2$, que corresponde ao espalhamento Raman (ω_{Raman}), está próxima da frequência do laser, ou seja, $\omega_{Laser} \sim \omega_{Raman}$, de forma que a condição de ressonância mais uma vez é satisfeita.^{3,4,78,90} O efeito SERS é altamente dependente da distância, podendo ser eliminado quando a distância $\mathbf{d}$ (Figura 12) atinge cerca de 150 Å.⁹¹

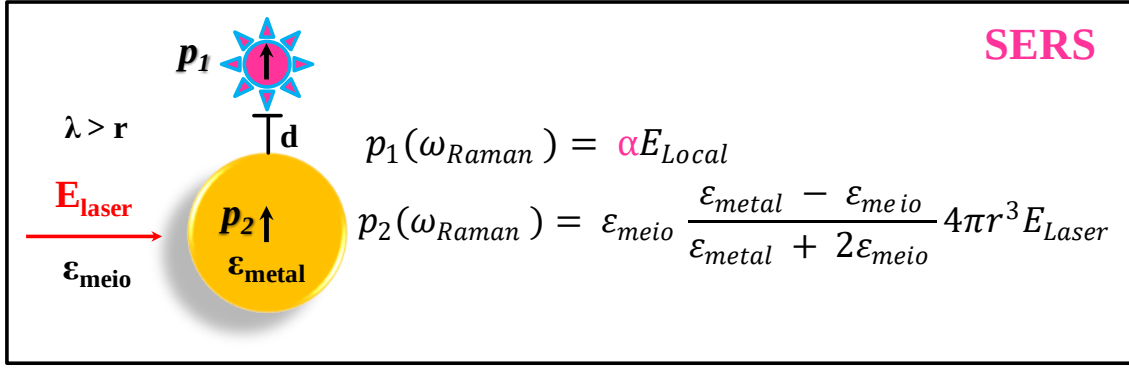


Figura 12: interpretação do efeito SERS para uma molécula, com dipolo molecular $\mathbf{p}_1$, adsorvida sobre uma nanopartícula metálica, com dipolo $\mathbf{p}_2$, que oscila com a mesma frequência de $\mathbf{p}_1$. A frequência de vibração de $\mathbf{p}_2$, correspondente ao espalhamento Raman (ω_{Raman}), está próxima da frequência do laser ($\omega_{Laser} \sim \omega_{Raman}$), satisfazendo a condição de ressonância.

Na prática, a amplificação do sinal Raman é determinada através do fator de amplificação (EF),⁷⁸ que mede quantas vezes o sinal de uma molécula “alvo” é amplificado quando comparado seu espectro Raman com o espectro SERS (ou seja na presença de nanoestruturas metálicas). Os valores de EF observados para experimentos SERS são da ordem de $10^3 - 10^6$,⁸⁵ podendo ser alcançado EF próximos a $10^8 - 10^{10}$ no caso de substratos SERS mais eficientes e/ou Raman ressonante (RR).⁷⁸

Do ponto de vista teórico, existem dois principais fatores eletromagnéticos para esses fatores de amplificação. Recordamos do eletromagnetismo básico que a intensidade da radiação em um certo ponto é sempre proporcional ao quadrado do campo elétrico nesse ponto. O primeiro termo de amplificação é chamado de fator de amplificação de intensidade do campo elétrico local, e geralmente é expresso como:^{78,92}

$$G_{Local} = |E^2| = \frac{|E_{Local}(\omega)|^2}{|E_{inc}|^2} \quad (5)$$

onde $\mathbf{E}_{Local}(\omega)$ é o campo elétrico local causado pela excitação das nanopartículas metálicas e $\mathbf{E}_{inc}$ é o campo elétrico incidente (do laser incidente no sistema), sendo que na presença das nanopartículas o $\mathbf{E}_{Local}(\omega)$ é muito maior que o $\mathbf{E}_{inc}$.

O segundo termo é chamado de fator de amplificação de radiação, causado pela re-emissão em um comprimento de onda diferente no espalhamento Raman (o campo espalhado), o qual é escrito como G_{rad} . Do ponto de vista físico, a resolução desse fator não é prática e é por isso que uma aproximação é empregada, negligenciando o deslocamento Raman, de forma que $G_{Local} = G_{rad}$ e:^{78,92}

$$EF_{SERS} = G_{Local}G_{rad} \approx G_{Local}G_{Local} \approx |E^4| \approx \frac{|E_{Local}(\omega)|^4}{|E_{inc}|^4} \quad (6)$$

Portanto, a amplificação SERS é proporcional a quarta potência do campo elétrico, sendo a expressão apresentada na equação (6) apenas uma aproximação, denominada E^4 .^{78,92}

Vale ressaltar que o EF é estritamente dependente da distância entre nanoestrutura metálica e molécula “alvo”, de forma que à medida que nos afastamos da superfície da nanoestrutura o campo elétrico diminui. Portanto, se considerarmos uma nanopartícula metálica de Au, Ag ou Cu, a maior amplificação será obtida quando a molécula estiver tocando a superfície da nanopartícula. Ao movermos a molécula para longe da superfície, o campo elétrico irá diminuir e, conseqüentemente, a amplificação também diminuirá. A diminuição da amplificação SERS para nanopartículas esféricas é dada pela equação (7), onde r é o raio da nanopartícula e d a distância entre molécula e nanopartícula:^{78,92}

$$Amplificação \downarrow \left| \frac{r}{r+d} \right|^{12} \quad (7)$$

Além das interações eletromagnéticas, onde a molécula de interesse adsorve fisicamente sobre a superfície metálica, a amplificação do sinal Raman também pode ser atribuída a interações químicas, a partir da adsorção química.⁹³ No mecanismo químico, a interação entre molécula e nanopartícula metálica é mais forte (valores de

energia mais negativos que -40 kJ/mol) que no caso do eletromagnético (valor da energia de interação mais positivo que -25 kJ/mol), como consequência maiores mudanças são observadas na magnitude da polarizabilidade Raman da molécula e portanto maior é a distorção da nuvem eletrônica da molécula.⁴

Quando a frequência que se usa para observar o espalhamento Raman coincide com uma frequência de transição eletrônica, temos o chamado Raman ressonante (RR). Se essa frequência atende ao mesmo tempo a condição de ressonância plasmônica, teremos o caso da dupla ressonância, o espalhamento Raman ressonante amplificado em superfície (SERRS, do inglês *surface-enhanced resonance Raman scattering*).⁹⁴ Quando a condição de RR é atendida, também observa-se amplificação, no entanto, em geral, nos casos de adsorção química pode-se observar aumento ou diminuição das intensidades relativas nos espectros Raman.⁹⁵ Há casos também em que as ressonâncias moleculares das espécies adsorvidas (moléculas adsorvidos sobre as superfícies metálicas) não são conhecidas. Em outras palavras, as interações com a superfície metálica podem mudar os níveis eletrônicos, podendo surgir novas ressonâncias.

A transferência de carga (CT, do inglês, *charge transfer*) é um caso especial de dupla ressonância ou SERRS.^{95,96} A ressonância de transferência de carga ocorre entre os níveis de energia dos elétrons da molécula e a banda de condução eletrônica do metal.⁹⁷ Na Figura 13 tem-se uma ilustração de um modelo baseado na formação de um complexo de CT entre molécula e nanopartícula metálica. Podemos notar que existe a possibilidade de transições eletrônicas em frequências bem menores do que a correspondente à transição HOMO-LUMO da molécula isolada.⁹⁷

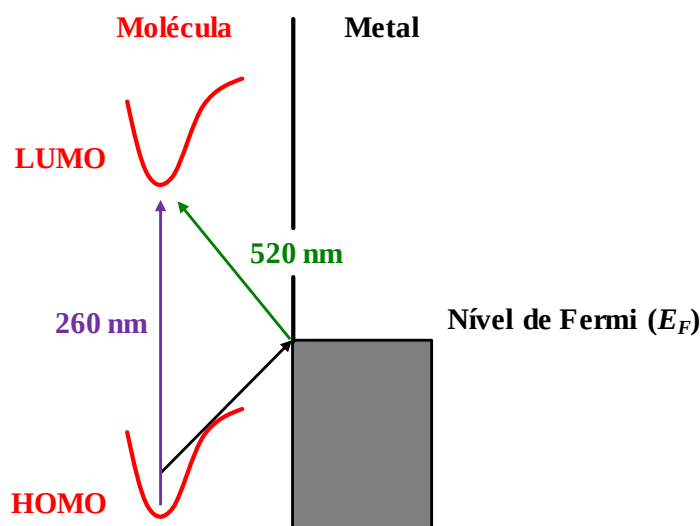


Figura 13: transferência de carga (CT) no complexo molécula – nanopartícula metálica. As curvas dos poços de potencial, no estado fundamental e excitado da molécula estão ilustradas bem como a banda de condução do metal. Adaptado de Aroca et al.⁹⁷

O efeito mecânico quântico está associado com a superposição das funções de onda eletrônicas da molécula e do metal, permitindo que ocorra o processo de CT. Desta forma, os fótons incidentes sobre o metal permitem que um elétron passe para um nível eletrônico desocupado da molécula (LUMO);^{98,99} previamente pode haver a passagem de um elétron do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) da molécula até o nível de Fermi do metal. Assim, uma molécula cujo máximo de absorção está ao redor do ultravioleta (260 nm) pode experimentar uma transição eletrônica suficiente para que se produza um RR.^{98,99} Em termos experimentais, a adsorção química é demonstrada pela presença de uma nova banda na região de baixas frequências, atribuída a vibração de estiramento molécula – metal.⁹⁷

2.5. Fluorescência amplificada em superfície (SEF)

A amplificação plasmônica da fluorescência ocorre quando uma molécula é irradiada com uma radiação eletromagnética em ressonância com uma de suas transições eletrônicas e está diretamente relacionada com a amplificação do campo local ao redor de nanoestruturas metálicas que sustentam LSPR.⁸⁸ O modelo matemático para

este fenômeno surgiu em 1981 denominado fluorescência amplificada em superfície (SEF, do inglês *surface-enhanced fluorescence*)⁸⁸ e tal nomenclatura permanece em uso até os dias atuais.⁷⁸ Uma segunda denominação foi introduzida em 2002 por Geddes e Lakowitz,¹⁰⁰ fluorescência amplificada por metais (MEF, do inglês *metal-enhanced fluorescence*). Este nome, embora em uso, é menos adequado para explicar o fenômeno, uma vez que os metais têm a característica de causar a supressão da fluorescência. Em 2010 uma nova abordagem utilizando nanoestruturas metálicas, introduzida pelo grupo de Tian,⁷ foi primordial para o avanço do fenômeno SEF. Trata-se de nanopartículas metálicas recobertas com uma camada ultrafina de sílica (SHINs, do inglês *shell-isolated nanoparticles*),⁷ aplicadas no fenômeno de amplificação SERS. Um ano mais tarde, o grupo de Aroca⁸ estendeu o conceito de SHINs para o efeito SEF, nomeando o acrônimo fluorescência amplificada em superfície por nanopartículas recobertas com sílica (SHINEF, do inglês *shell-isolated nanoparticle enhanced fluorescence*). Basicamente, uma camada mais espessa de sílica (5 – 20 nm de espessura) é empregada em torno das nanopartículas evitando a supressão da fluorescência e aproveitando o campo amplificado, que se estende para distâncias maiores que 5 nm.⁹⁷ A influência das espessuras de recobrimento com sílica nos efeitos SERS e SEF estão ilustradas na Figura 14.

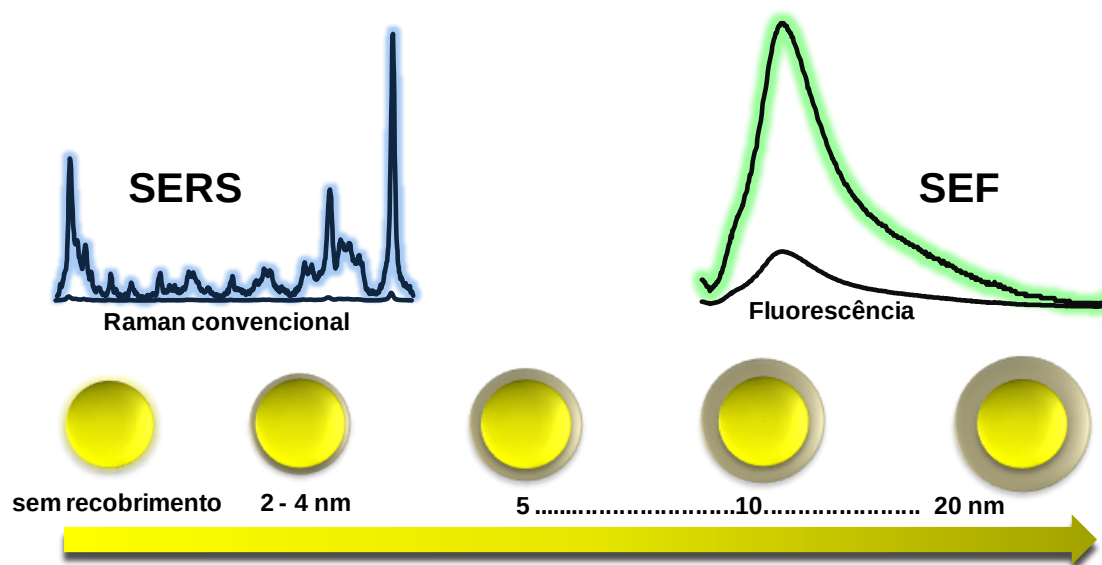


Figura 14: ilustração da dependência dos efeitos SERS e SEF em função do recobrimento das nanopartículas metálicas.

Para melhor compressão do efeito SEF é necessário definir algumas características do fenômeno e sua relação com o modelo plasmônico de amplificação, dentre as quais destacam-se:

- i) assim como no efeito SERS, a amplificação SEF é função da distância molécula – nanoestrutura metálica, e se dá pela competição entre a transferência de energia (Föster) da molécula para o metal no campo próximo do metal, e a amplificação se deve ao espalhamento do *plasmon*.^{101,102} Para cada caso, uma distância ótima molécula – nanoestrutura é necessária para alcançar um máximo de amplificação da fluorescência.
- ii) em nanopartículas metálicas pequenas (< 30 nm) a absorção se sobressai ao espalhamento, enquanto que para nanopartículas maiores ocorre o contrário. Desta forma, deve-se buscar tamanhos de nanopartículas com máxima eficiência, levando em consideração que o tamanho deve ser muito menor que o comprimento de onda de excitação.¹⁰

- iii) a radiação emitida pela molécula fluorescente é reemitida pela nanoestrutura, cujo *plasmon* oscila na mesma frequência de emissão da molécula. Dessa forma, para maior eficiência da amplificação, a emissão molecular deve estar em ressonância com o *plasmon* localizado da nanoestrutura.¹⁰³
- iv) por fim, tem-se as modificações das propriedades moleculares, como o rendimento quântico (Φ_f) e o tempo de vida do estado excitado (τ). Tais propriedades se originam a partir do decaimento espontâneo de um emissor no estado excitado através de um canal radiativo (emissão da fluorescência) e canais não-radiativos. A superfície metálica não só pode afetar os processos radiativos e não-radiativos, como também pode ter um impacto sobre a fotoestabilidade dos emissores quânticos, e consequentemente reduzir a emissão. Por outro lado, o tempo de vida do estado excitado diminui e os processos químicos que envolvem o estado excitado também diminuem.⁹⁷

O modelo matemático proposto por Gersten e Nitzan⁸⁸ para a amplificação da fluorescência é específico para o caso de uma molécula adsorvida, ou ao redor de uma nanopartícula metálica esférica, focando nas propriedades espectroscópicas dos tempos de vida radiativos e não-radiativos e do rendimento quântico, sendo a amplificação do E_{Local} determinante na amplificação.³ Considerando uma nanopartícula esférica, de raio r e dipolo molecular μ , posicionada a uma distância d do centro da esfera, o campo local é dado por:^{3,92}

$$E_{Local} = \left[1 + 2 \frac{\varepsilon(\omega)+1}{\varepsilon(\omega)+2} \left(\frac{r}{d} \right)^3 \right] E_{inc} \quad (8)$$

onde ω é a frequência angular incidente, E_{inc} é o campo elétrico incidente e ε é a função dielétrica. Dessa forma, o momento de dipolo total (μ_{total}) do sistema será dado por:

$$\mu_{total} = \left[1 + 2 \frac{\varepsilon(\omega_f)+1}{\varepsilon(\omega_f)+2} \left(\frac{r}{d} \right)^3 \right] \mu \quad (9)$$

sendo ω_f a frequência angular de emissão. Assim, a emissão do sistema é proporcional a $|\mu_{total}|^2$ e, portanto, a amplificação será determinada pelo quadrado do campo local. A partir daí define-se o EF para o fenômeno SEF como:^{3,92}

$$|E|^2 = \left| \frac{E_{Local}}{E_{inc}} \right|^2 \quad (10)$$

Enquanto em SERS máximos EF são observados na superfície da nanoestrutura ($d = 0$), em SEF máximos EF são observados para distâncias $d \neq 0$ entre molécula – nanoestrutura metálica. Este efeito da distância na amplificação da fluorescência pode ser exemplificado considerando um modelo simples de uma nanopartícula esférica de raio r e uma molécula fluorescente a uma distância d , onde o E_{Local} amplificado depende da distância, e essa dependência é dada por $\left| \frac{r}{r+d} \right|^6$,⁹⁶ indicando um decaimento lento do E_{Local} à medida que d aumenta. A curtas distâncias da superfície metálica, há uma dependência de $\left| \frac{1}{d^3} \right|$ para o aumento dos decaimentos não-radiativos, levando a supressão da fluorescência.^{101,104} Dessa forma, a máxima amplificação é alcançada pela diferença $\left| \frac{r}{r+d} \right|^6 - \left| \frac{1}{d^3} \right|$.^{97,105}

Capítulo 3

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

A protoporfirina dimetil éster (PPIX) foi sintetizada a partir da hematoporfirina sob condições de desidratação por catálise ácida e também esterificação por catálise ácida, cujos detalhes estão descritos em^{106,107}. A protoporfirina (IX) dimetil éster de zinco(II) (ZnPPIX-DME, $\text{ZnC}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{N}_4$, MM = 654,09 g/mol), cuja estrutura molecular é representada na Figura 15, foi preparada a partir da PPIX por metalação simples usando $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$. O produto foi caracterizado por ressonância magnética nuclear (^1H -RMN) e espectroscopia de extinção no ultravioleta-visível (UV-Vis) e usado sem purificação adicional conforme fornecido pelo professor Dr. Kleber Thiago de Oliveira (UFSCar). As demais moléculas estudadas, cujas estruturas também estão apresentadas na Figura 15, foram: cristal violeta (CV, $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$, MM = 407,98 g/mol) adquirida da Aldrich; bis(pentadecilimido) perileno (15CPTCD, $\text{C}_{54}\text{H}_{70}\text{O}_4\text{N}_2$, MM = 811,21 g/mol) fornecido pelo professor Dr. Ricardo F. Aroca da University of Windsor, Canadá, eosina decil éster (EOSDEC, $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Br}_4$, MM = 788,13 g/mol) sintetizada de acordo com Estevão et al.,¹⁰⁸ ametrina (AMT, $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_5\text{S}$, MM = 227,33 g/mol) e azul do Nilo A perclorato (NB, $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}_5$, MM = 417,84 g/mol, 95%) adquiridos da Sigma-Aldrich. O ácido esteárico (AE, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$, MM = 284,48 g/mol) e os reagentes ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, MM = 393,83 g/mol), citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MM = 294,10 g/mol), hidroxilamina hidrociorada ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, MM = 69,49 g/mol), 3-aminopropil-trimetoxi-silano (APTMS, $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Si}$, MM = 179,29 g/mol, $d = 1,027 \text{ g/mL}$), solução de silicato de sódio (10,6% Na_2O e 26,5% SiO_2 , $d = 1,39 \text{ g/mL}$), isocianato de 3-(triethoxisilil)propilo ($((\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}$

(CH₂)₃NCO, MM = 247,36 g/mol, 95%), tetraetilortosilicato (TEOS, Si(OC₂H₅)₄, MM = 208,33 g/mol) e tampão fosfato salino (PBS, 10x concentrado, adequado para cultura celular) foram obtidos da Sigma-Aldrich e usados sem posterior purificação. Cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, C₈H₁₇N₃.HCl, MM = 191,70 g/mol), N-hidroxisuccinimida (NHS, C₄H₅NO₃, MM = 115,09 g/mol), antígeno IgM (Imunoglobulina-M) de soro humano (solução aquosa tamponada, ~ 95 %), anticorpo monoclonal IgM e anticorpo policlonal IgM também foram adquiridos da Sigma-Aldrich e 3-trietoxisililpropil succínico anidrido (TEPSA, C₁₃H₂₄O₆Si, MM = 304,41 g/mol, d = 1,070 g/mL, 95%) foi obtido da Gelest. Os anticorpos monoclonais da Zika NS1 e antígenos do vírus da Zika NS1 foram adquiridos via Aalto Bio Reagents e antígenos do vírus da Dengue NS1 da ViroStat Inc. Os solventes diclorometano (CH₂Cl₂, MM = 84,93 g/mol, grau HPLC) e clorofórmio (CHCl₃, MM = 119,38 g/mol, grau HPLC) foram adquiridos da Merck e o ácido trifluoroacético (C₂HF₃O₂, MM = 114,02 g/mol, grau espectrométrico) da Aldrich. A água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ.cm e pH = 5,6) foi obtida de um sistema de purificação de água Mili-Q (modelo Simplicity). Ácido sulfúrico (H₂SO₄, MM = 98,08 g/mol, d = 1,84 g/mL, 98%) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, MM = 34,01 g/mol, d= 1,13 g/mL, 35%) foram adquiridos da Synth e usados na preparação da solução piranha (H₂SO₄/H₂O₂ na proporção 1:1) para limpeza das vidrarias empregadas nas sínteses. Posteriormente, tais vidrarias foram enxaguadas extensivamente com água ultrapura.

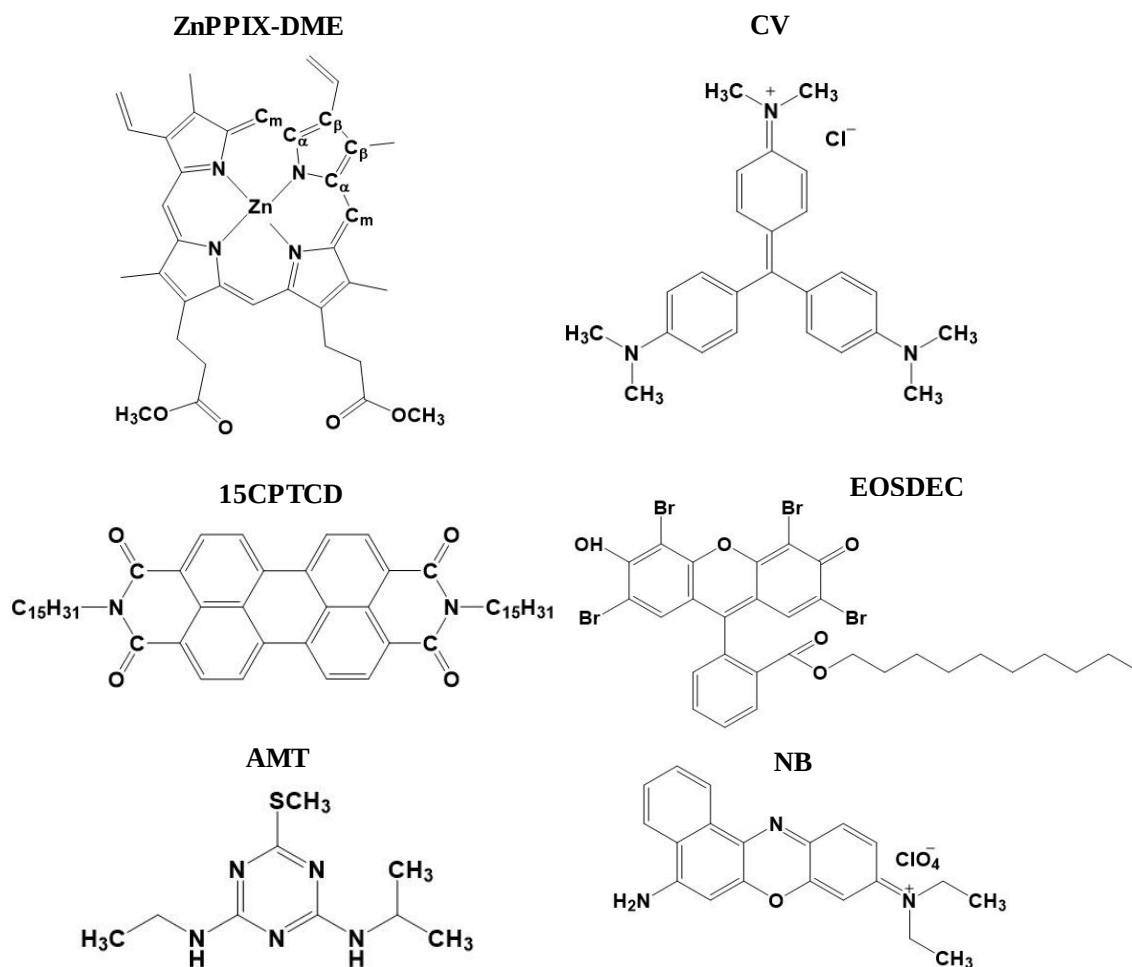


Figura 15: estruturas moleculares da ZnPPIX-DME, CV, 15CPTCD, EOSDEC, AMT e NB. Na molécula de ZnPPIX-DME tem-se representados os carbonos meso (C_m), alfa (C_α) e beta (C_β).

3.2. Filmes de Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS) de ZnPPIX-DME

Os filmes de Langmuir, LB e LS de ZnPPIX-DME foram fabricados utilizando uma cuba de Langmuir KSV-NIMA, modelo KN2002 medium (dimensão = 75 mm x 320 mm e área = 24000 mm²) com volume da subfase de 220 mL. Os filmes foram produzidos em subfase aquosa espalhando 40 µL da solução de ZnPPIX-DME solubilizada em diclorometano a uma concentração de 0,50 mg/mL (0,77 mmol/L). As monocamadas de Langmuir na interface ar/água ultrapura foram caracterizadas por isotermas de pressão de superfície vs área molecular média (isotermas π -A) a 23 °C

usando o método Wilhelmy.⁵⁸ Os filmes de Langmuir de ZnPPIX-DME foram comprimidos simetricamente com velocidades de 5, 10, 15, 20, 50 e 100 mm/min. Complementarmente, medidas de histerese (4 ciclos consecutivos de compressão-expansão) foram realizadas no filme de Langmuir comprimido com velocidade de 10 mm/min. Além disso, imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) foram obtidas para os filmes de Langmuir de ZnPPIX-DME usando um microscópio KSV NIMA micro-BAM. As imagens de BAM foram coletadas para diferentes áreas e pressões de superfície durante a compressão do filme na interface ar/água ultrapura.

Os filmes LB e LS foram obtidos transferindo as monocamadas de Langmuir de ZnPPIX-DME da interface ar/água ultrapura diretamente sobre diferentes substratos sólidos, dependendo da caracterização a ser realizada. A pressão de superfície foi mantida constante em 30 mN/m e a velocidade das barreiras a 10 mm/min (compressão simétrica). Os filmes LB foram depositados por emersão do substrato na posição vertical com velocidade do braço mecânico variando entre 0,2 a 1,0 mm/min. Durante a deposição, a velocidade do braço mecânico foi variada neste intervalo para manter a transferência acumulada próxima do valor unitário. Sob estas condições filmes LB do tipo Z foram fabricados (Z: deposição somente na emersão do substrato). Os filmes LS foram depositados aproximando-se manualmente o substrato na posição horizontal da interface ar/água ultrapura. Neste caso, como não é possível controlar a transferência acumulada à medida que as monocamadas são transferidas para o substrato, já que toda a camada é depositada ao mesmo tempo, a variação na posição da barreira foi acompanhada e a TR foi calculada posteriormente, ao final de cada camada LS depositada. A Figura 16 apresenta os parâmetros experimentais aplicados para monitorar a TR nos filmes LB e LS de ZnPPIX-DME.

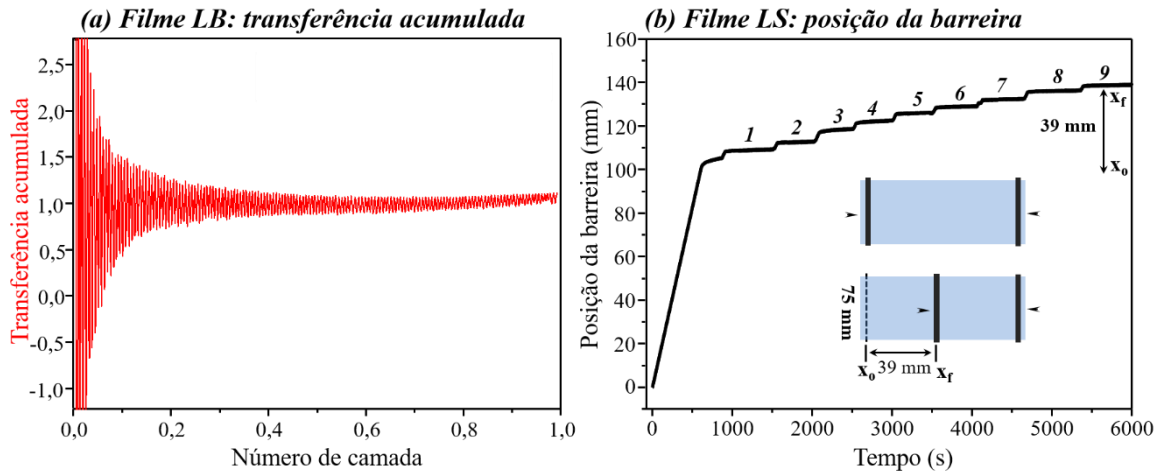


Figura 16: parâmetros experimentais aplicados na transferência dos filmes LB e LS de ZnPPiX-DME. (a) Transferência acumulada vs. número de camada, parâmetro controlado durante a deposição de cada monocamada de filme LB. (b) Posição da barreira vs. tempo, parâmetro monitorado durante a deposição do filme LS e usado para calcular a TR ao final de cada camada depositada.

Como observado na Figura 16, a TR para o filme LB é controlada a cada monocamada depositada, podendo inclusive ser monitorada durante a deposição de cada monocamada (transferência acumulada), enquanto para o filme LS essa razão é calculada considerando o número total de camadas depositadas, conforme apresentado nos cálculos abaixo:

$$A_{barreira} = 75 \text{ mm} \times 39 \text{ mm} = \frac{2925 \text{ mm}^2}{9 \text{ camadas}}$$

$$A_{barreira} = 325 \text{ mm}^2/\text{camada}$$

$$A_{substrato} = 34 \text{ mm} \times 12 \text{ mm} = 408 \text{ mm}^2$$

$$TR = \frac{A_{barreira}}{A_{substrato}} = \frac{325 \text{ mm}^2}{408 \text{ mm}^2} = 0,8$$

3.3. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de ZnPPIX-DME+AuNPs

Filmes de Langmuir e LB de ZnPPIX-DME foram fabricados em uma cuba de Langmuir KSV-NIMA, modelo KN 2001, com volume da subfase de 70 mL. Os filmes de Langmuir foram produzidos espalhando 15 μ L de ZnPPIX-DME solubilizada em diclorometano a uma concentração de 0,5 mg/mL (0,77 mmol/L) em subfases contendo água ultrapura ou suspensão coloidal de AuNPs. As monocamadas de Langmuir foram comprimidas simetricamente sob velocidade constante de 5 mm/min e caracterizadas por isotermas de pressão de superfície vs área molecular média (isotermas π -A) a 23 °C pelo método de Wilhelmy.⁵⁸

Os filmes LB foram obtidos transferindo as monocamadas de Langmuir da interface ar/água ultrapura, contendo água ultrapura ou coloide de AuNPs na subfase, para substratos de quartzo. Esses filmes são nomeados: filmes LB de ZnPPIX-DME e de ZnPPIX-DME+AuNPs, respectivamente. Durante a deposição dos filmes LB as monocamadas foram comprimidas simetricamente com velocidade das barreiras de 5 mm/min. A pressão de superfície foi mantida constante a 30 mN/m para o filme LB de ZnPPIX-DME e a 20 mN/m para o filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs. Neste último caso, o valor mais baixo de pressão de superfície justifica-se pelo início da sobreposição da isoterma de ZnPPIX-DME+AuNPs à isoterma de ZnPPIX-DME em valores próximos a 30 mN/m. Os filmes LB foram depositados por emersão dos substratos verticalmente com velocidades de 0,2 a 1,0 mm/min. Durante a deposição, a velocidade do braço mecânico foi variada neste intervalo para manter os valores de transferência acumulada próximos de 1,0, produzindo filmes LB do tipo Z (deposição somente durante a emersão do substrato).

3.4. Síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs)

AuNPs, com aproximadamente 16 nm de diâmetro, foram preparadas por redução do HAuCl_4 via citrato de sódio.^{10,109} Em uma balão de fundo redondo equipado com condensador, 150 mL de HAuCl_4 0,5 mmol/L são colocados em aquecimento sob vigorosa agitação magnética. Quando a solução atinge ebulição, 7,5 mL de citrato de sódio 38,8 mmol/L são adicionados rapidamente resultando em uma coloração vermelho-púrpura. A suspensão coloidal de AuNPs foi mantida em ebulição e agitação por 10 minutos, removida do aquecimento, e deixada em agitação vigorosa por mais 15 minutos. O coloide foi então resfriado a temperatura ambiente (23 °C) e caracterizado por espectroscopia de extinção. A concentração final da suspensão coloidal é ca. $7,2 \times 10^{12}$ AuNPs/mL. Na Figura 17 tem-se o fluxograma da síntese.

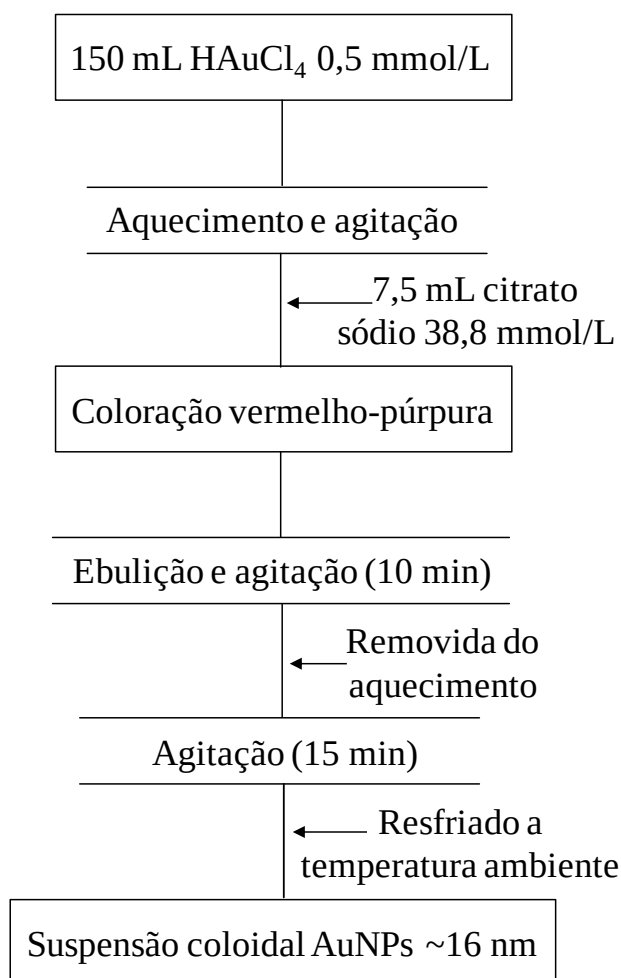


Figura 17: fluxograma da síntese de AuNPs com aproximadamente 16 nm de diâmetro.

3.5. Síntese de nanopartículas de ouro recobertas com sílica (Au-SHINs)

A sigla Au-SHINs (do inglês, *gold shell-isolated nanoparticles*) será utilizada referindo-se às nanopartículas de ouro recobertas com sílica. Os procedimentos descritos abaixo (itens 3.5.1. e 3.5.2.) foram aplicados a fim de obter nanopartículas de ouro com tamanhos diferentes (40 nm e 100 nm) recobertas com diferentes espessuras de sílica.

3.5.1. Nanopartículas de ouro com 40 nm de diâmetro recobertas com sílica (Au-SHINs 40 nm)

Au-SHINs 40 nm foram sintetizadas conforme metodologias propostas por Aroca et al.¹⁰ e Grabar et al.¹⁰⁹ com pequenas modificações. Primeiramente, AuNPs com 40 nm de diâmetro foram preparadas via redução com citrato de sódio. Em um balão de fundo redondo contendo um condensador, 100 mL de HAuCl₄ 0,01% foram levados a ebulição sob vigorosa agitação magnética. 1,3 mL de citrato de sódio 1% foram adicionados rapidamente, e após a solução tornar-se vermelho-púrpura o aquecimento e agitação vigorosa foram mantidos por 10 minutos. O coloide foi removido do aquecimento e deixado em agitação vigorosa por mais 15 minutos, e então resfriado a temperatura ambiente (23 °C) para posterior recobrimento com sílica. Em um balão de fundo redondo, equipado com sistema de refluxo, 25 mL de coloide AuNPs 40 nm foram colocados sob vigorosa agitação com 3 mL de uma solução recém-preparada de APTMS 1 mmol/L. Após 10 minutos, 6 mL de solução de silicato de sódio 0,54% (pH = 10 – 11) foram adicionados e a mistura foi mantida em agitação suave por mais 3 minutos. O sistema foi então levado a aquecimento em banho térmico a temperaturas entre 90 – 95 °C. Ao atingir essa faixa de temperatura, as amostras de Au-SHINs 40 nm foram recolhidas a cada 30 minutos até 3 horas, adicionadas a tubos de centrifugação de 1,5 mL e centrifugadas a 13000g por 7 minutos. O sobrenadante foi decantado e as

SHINs foram redispersas em água ultrapura. Esse procedimento foi realizado 3 vezes, removendo a maior parte do sobrenadante e obtendo Au-SHINs 40 nm limpas e concentradas, aproximadamente $1,5 \times 10^{12}$ Au-SHINs/mL. Na Figura 18 tem-se o fluxograma da síntese e recobrimento das AuNPs, gerando as Au-SHINs 40 nm.

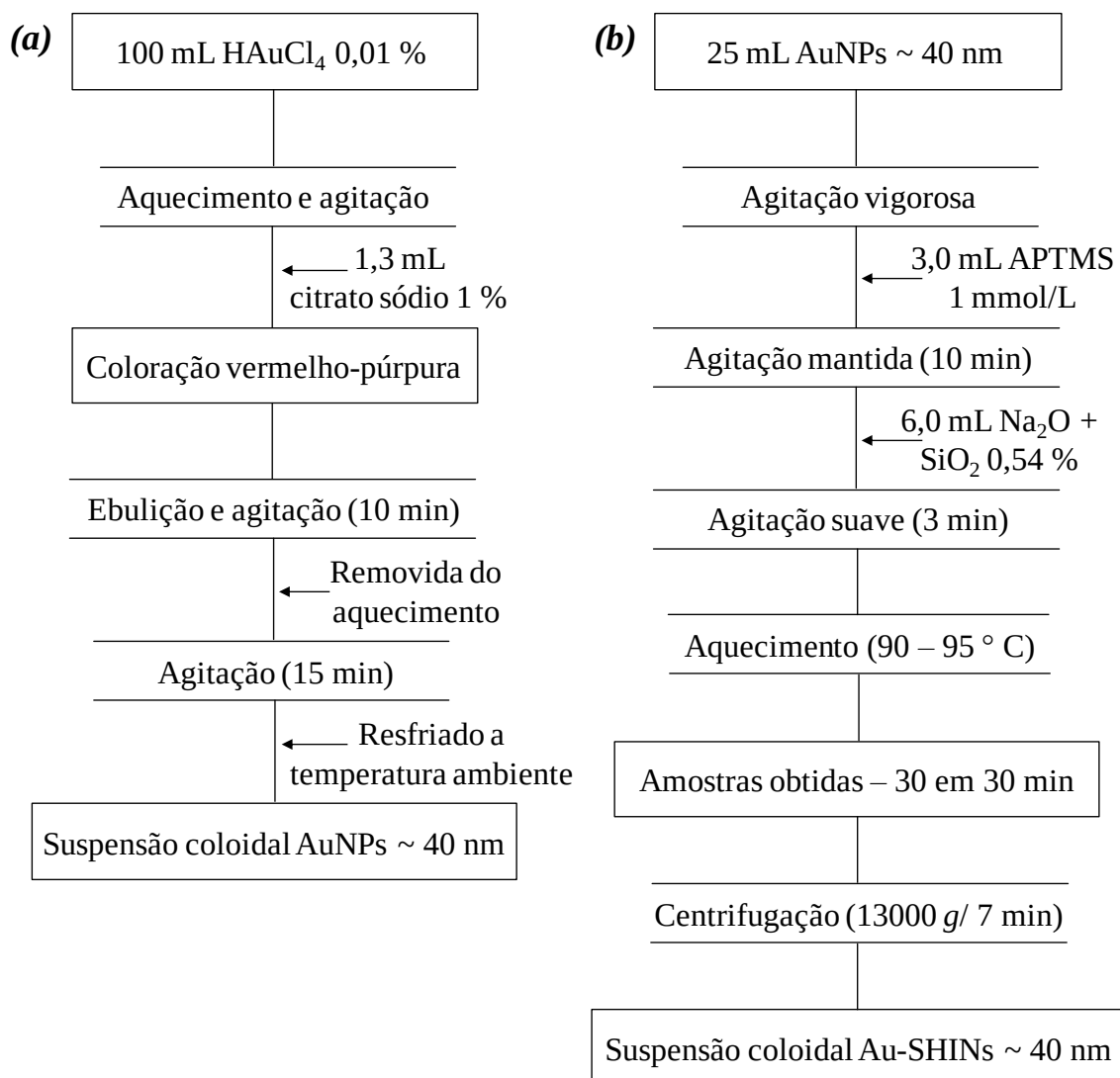


Figura 18: fluxograma da síntese e recobrimento das Au-SHINs com aproximadamente 40 nm de diâmetro.

3.5.2. Nanopartículas de ouro com 100 nm de diâmetro recobertas com sílica (Au-SHINs 100 nm)

Au-SHINs 100 nm foram sintetizadas de acordo com Li et al.⁴⁶ com pequenas modificações. Primeiro, AuNPs com 100 nm de diâmetro foram preparadas diluindo 4

mL da suspensão coloidal de AuNPs 40 nm em 53 mL de água ultrapura. A mistura foi colocada em um balão de fundo redondo onde 0,9 mL de citrato de sódio 1% foram acrescentados e mantidos em agitação vigorosa por 3 minutos. Após esse período, 0,9 mL de HAuCl_4 1% foram adicionados e o sistema foi mantido em agitação vigorosa por mais 8 minutos. O crescimento das AuNPs se dá pela adição de 1,4 mL de solução de hidroxilamina 10 mmol/L, gota a gota (a cada 10 segundos) sob vigorosa agitação magnética. Após 5 minutos a adição de hidroxilamina é completada, mas a agitação vigorosa foi mantida por mais 1 hora a temperatura ambiente (23 °C). O recobrimento das AuNPs 100 nm com sílica se deu a partir da diluição de 15 mL do coloide em 15 mL de água ultrapura, colocados em um balão de fundo redondo. Posteriormente, 0,5 mL de uma solução recém-preparada de APTMS 0,5 mmol/L foram adicionados ao balão e mantidos em agitação suave por 20 minutos. Em seguida, 2,8 mL de silicato de sódio 0,54% (pH = 10-11) foram adicionados a mistura e a agitação suave foi mantida por mais 3 minutos. O sistema foi levado rapidamente para banho térmico a temperaturas entre 90 – 95 °C e as amostras foram coletadas a cada 1 hora, até 6 horas. As Au-SHINs 100 nm foram transferidas para tubos de centrifugação de 1,5 mL, centrifugadas a 6000g por 10 minutos, decantado e removido o sobrenadante e redispersas em água ultrapura. Esse procedimento foi repetido 3 vezes a fim de obter Au-SHINs limpas e concentradas, aproximadamente $1,1 \times 10^{12}$ Au-SHINs/mL. Na Figura 19 tem-se o fluxograma da síntese e recobrimento das AuNPs, gerando as Au-SHINs 100 nm.

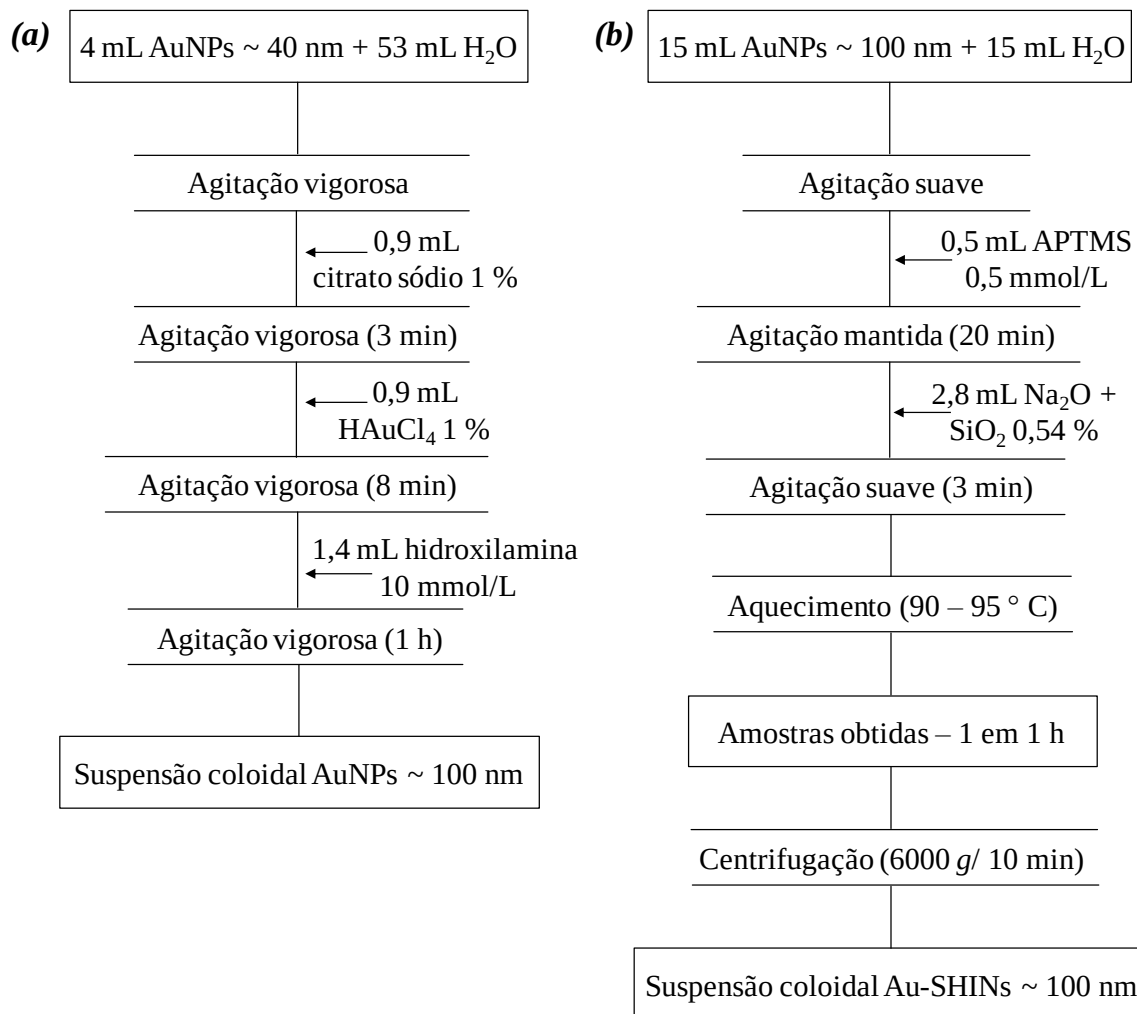


Figura 19: fluxograma da síntese e recobrimento das Au-SHINs com aproximadamente 100 nm de diâmetro.

3.6. Medidas de fluorescência amplificada em superfície por nanopartículas recobertas com sílica

Como mencionado anteriormente, a fim de evitarmos acrônimos, iremos sempre nos referir a terminologia geral aplicada ao fenômeno de fluorescência amplificada em superfície (SEF). Medidas de SEF em solução foram realizadas por adição (em recipientes separados) de 100 μL das Au-SHINs (40 e 100 nm, com tempos de recobrimento de 3 e 6 horas, respectivamente), alíquotas de 100 μL de solução estoque de CV (6×10^{-5} mol/L) e água ultrapura completando o volume dos tubos de centrifugação até 1 mL. A análise do efeito de agregação das Au-SHINs foi realizada a

partir da adição de alíquotas de 200, 500 e 800 μL de NaCl 0,1 mol/L, obtendo diferentes concentrações desse eletrólito (0,02, 0,05 and 0,08 mol/L). Sendo que na concentração de NaCl de 0,08 mol/L, não houve adição de água: 100 μL de CV, 100 μL de Au-SHINs e 800 μL de solução de NaCl.

As monocamadas LB de 15CPTCD/AE e EOSDEC, utilizadas nas medidas de SEF, foram fabricadas em uma cuba de Langmuir KSV, modelo 2000, contendo água ultrapura na subfase a temperatura ambiente (23 °C). Em ambos os casos, a solução foi espalhada na interface ar/água ultrapura e esperou-se um período de 20 minutos para assegurar completa evaporação do solvente. Em seguida, a monocamada foi comprimida simetricamente sob uma velocidade constante das barreiras de 10 mm/min, formando uma monocamada de Langmuir na interface ar/água ultrapura. Durante a transferência da monocamada para o substrato de quartzo a superfície de pressão foi mantida em 30 mN/m. A monocamada mista de 15CPTCD/AE foi obtida espalhando-se 200 μL de solução de 15CPTCD/AE (razão molar 1:1000) preparada em diclorometano com 10% do volume de ácido trifluoroacético. A transferência da monocamada foi realizada com velocidade de emersão de 5 mm/min. Já a monocamada LB de EOSDEC foi depositada espalhando-se 60 μL de solução de EOSDEC em clorofórmio (0,5 mg/mL) e transferindo a monocamada com velocidade de emersão de 2,5 mm/min. Nos experimentos de SEF em monocamadas LB, 5 μL de Au-SHINs 40 e 100 nm, recobertas com sílica por 3 e 6 horas, respectivamente, foram espalhados sobre as monocamadas.

3.7. Medidas de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS) para detecção do herbicida ametrina

Medidas de SERS foram realizadas para detecção do herbicida ametrina (AMT) em solução, com concentração final de 10^{-5} mol/L, e na superfície de cana-de-açúcar, com

concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , $5,3 \times 10^{-8}$ e 10^{-8} mol/L. A AMT foi utilizada conforme adquirida da Sigma-Aldrich, sem nenhum tratamento prévio (purificação).

As medidas em solução foram realizadas por adição (em recipientes separados) de 100 μ L das AuNPs 100 nm ou Au-SHINs 100 nm recobertas com sílica por 1 hora, alíquotas de 100 μ L de solução etanólica de AMT (10^{-4} mol/L) e água ultrapura completando o volume dos recipientes até 1 mL. Os espectros SERS foram obtidos ajustando o foco do laser na interface ar/coloide + solução de AMT sobre pequenos volumes (~ 200 μ L) alocados em um suporte.

Já as medidas em cana-de-açúcar foram realizadas a partir de adaptações do método “*spray de superfície*” desenvolvido por Fang et al.¹⁹ Pequenos pedaços de cana-de-açúcar ($\sim 0,2$ a $0,4$ gramas) foram cortados e lavados sucessivas vezes (no mínimo 3x cada) com etanol e água ultrapura. Posteriormente, soluções etanólicas de AMT (10^{-3} a 10^{-8} mol/L) foram borrifadas sobre as superfícies das amostras, mantendo os seguintes parâmetros: 2 mL de cada concentração de AMT borrifados sobre a superfície dos seus respectivos pedaços de cana de açúcar; 15 cm de distância entre o borrifador e a amostra; pressão do borrifador de 30 psi e 10 segundos de tempo de spray. Após completa evaporação das soluções de AMT, a temperatura ambiente (25°C), 5 μ L de coloide (AuNPs 100 nm ou Au-SHINs 100 nm) foram espalhados sobre a superfície da cana-de-açúcar e após um tempo de secagem de 15 minutos espectros SERS foram obtidos ajustando o foco do laser sobre a superfície da amostra. A Figura 20 exibe um esquema ilustrativo do procedimento experimental usado na detecção de AMT em cana-de-açúcar e uma fotografia (câmera digital) da amostra (cana-de-açúcar) sob a lente do microscópio utilizado nas medidas SERS de AMT.

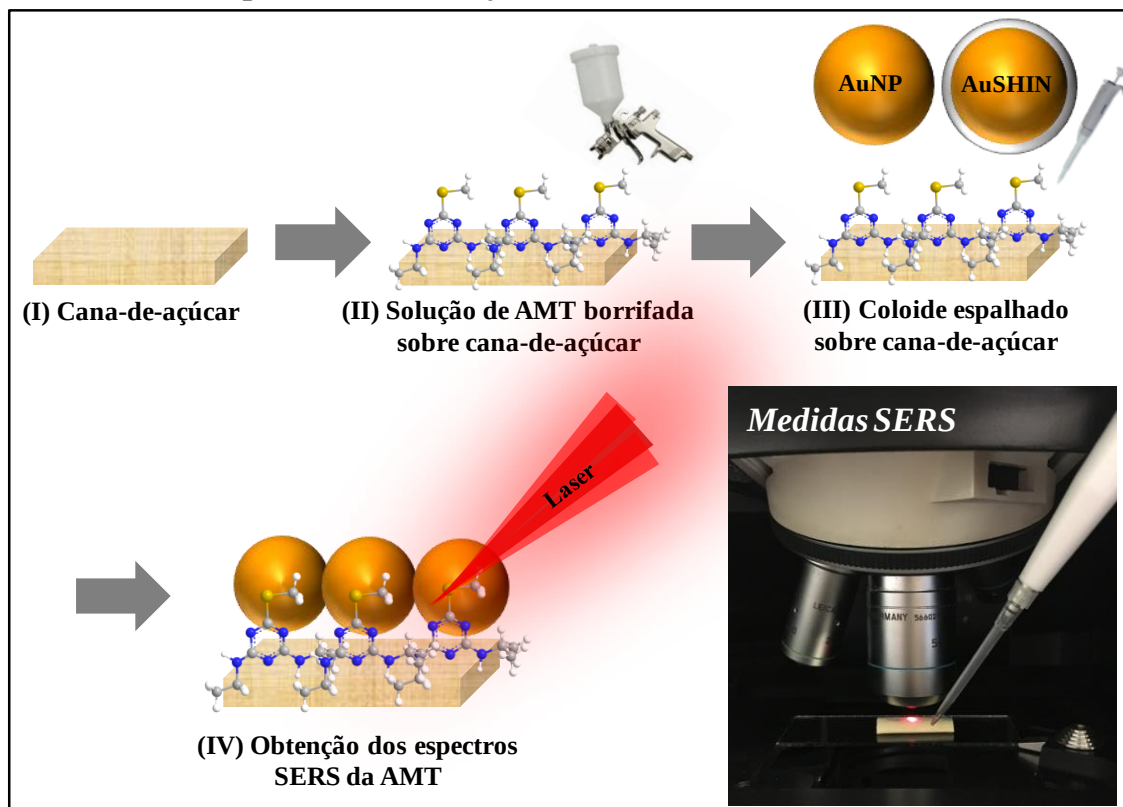
Procedimento experimental: detecção de AMT

Figura 20: esquema ilustrativo do procedimento experimental usado na detecção de AMT em cana-de-açúcar via SERS. *Inset:* fotografia (câmera digital) do sistema utilizado nas medidas SERS de AMT em cana-de-açúcar.

3.8. Imunoensaios de detecção baseados na fluorescência amplificada em superfície (SEF) e no espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS)

Os procedimentos descritos nas seções posteriores (3.8.1 a 3.8.4) foram utilizados no desenvolvimento e aplicação de duas plataformas de imunoensaio distintas: a primeira baseada no efeito SEF para detecção do antígeno IgM e a segunda no SERS para detecção da antígeno do vírus da Zika.

3.8.1. Fabricação das *tags* de fluorescência amplificada em superfície (SEF *tags*) e de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS *tags*)

As SEF *tags* foram fabricadas a partir de Au-SHINs 100 nm recobertas com sílica por 6 horas, enquanto as SERS *tags* foram produzidas a partir de Au-SHINs recobertas

com sílica por apenas 1 hora. Em ambos os casos a eficiência do recobrimento com sílica foi validada. Nas SEF *tags*, a eficiência do recobrimento das Au-SHINs na amplificação da fluorescência, foi confirmada misturando soluções de NB (10^{-5} mol/L) com AuNPs 100 nm e Au-SHINs 100 nm recobertas com sílica por 6 horas, resultando em soluções de NB com concentrações finais de 10^{-6} mol/L. Experimento semelhante foi realizado para as SERS *tags* a fim de avaliar a eficiência do recobrimento das Au-SHINs na amplificação do sinal Raman. Soluções de NB (10^{-5} mol/L) foram misturadas com AuNPs 100 nm e Au-SHINs 100 nm recobertas com sílica por apenas 1 horas. Volumes conhecidos das soluções descritas acima foram adicionados sobre substratos, secados, para realização de medidas de fluorescência, Raman, SEF, SERS e SERRS.

A fabricação das *tags* se deu a partir da preparação de um precursor de sílica e azul do Nilo (sílica-NB) conforme metodologia proposta por Grandi et al.¹¹⁰ 4×10^{-5} mols de NB (8,0 mL de 5×10^{-3} mol/L) foram misturados com 4×10^{-5} mols de isocianato de 3-(triethoxisilil) propilo (10,45 μ L de 3,8 mol/L), sob agitação vigorosa por 24 horas a temperatura ambiente. O grupo isotiocianato do isocianato de 3-(triethoxisilil) propilo liga-se covalentemente ao amino terminal do NB, formando o precursor sílica-NB.

A fabricação das SEF *tags* deu-se a partir de pequenas modificações do método proposto por Lee et al.³⁵ Em uma primeira etapa, 250 μ L de Au-SHINs 100 nm com 6 horas de recobrimento com sílica ($1,1 \times 10^{12}$ Au-SHINs/mL) foram diluídas em 2,75 mL de água ultrapura e 20 mL de isopropanol. Esta suspensão coloidal diluída foi misturada com 9,2 μ L do precursor sílica-NB (5×10^{-3} mol/L) por 30 minutos sob agitação vigorosa, seguida da adição de 9,2 μ L de TEOS (1×10^{-4} mol/L) e 20 μ L de NH_4OH (28-30%). A mistura foi mantida sob agitação por 4 dias, antes de ser centrifugada a 10000g por 10 minutos. O sobrenadante foi decantado e as SEF *tags* foram redispersas em água ultrapura. Esse processo de lavagem foi repetido no mínimo 5 vezes a fim de obter SEF

tags limpas e concentradas. A variação da intensidade de fluorescência das SEF *tags* foi acompanhada a cada etapa de lavagem, garantindo que o excesso de moléculas de NB foi removido. Na Figura 21a tem-se um esquema ilustrativo de cada etapa de fabricação das SEF *tags*. As SERS *tags* foram fabricadas seguindo o mesmo procedimento com exceção das Au-SHINs 100 nm utilizadas, que foram as recobertas com sílica por apenas 1 hora, resultando em uma camada ultrafina de sílica.

3.8.2. Conjugação das SEF *tags* com anticorpos IgM e das SERS *tags* com anticorpos da Zika

SEF *tags* conjugadas com anticorpos policlonais IgM (pAb) foram preparadas conforme descrito por Li et al.,⁴⁵ com pequenas modificações. Primeiramente, 200 μ L de SEF *tags* ($1,1 \times 10^{12}$ SEF *tags*/mL) foram centrifugadas a 10000g por 10 minutos e redispersas em 200 μ L de etanol. As SEF *tags* foram então incubadas durante a noite (por 20 horas) em 1,0 mL de TEPSA (solução etanólica, 0,12 mol/L) a temperatura ambiente, sob agitação vigorosa, a fim de modificar a superfície das SEF *tags* com grupos carboxílicos. Após essa etapa, as SEF *tags* foram lavadas 3 vezes com tampão PBS e incubadas, sob agitação por 2 horas e a temperatura ambiente, em 1,0 mL de solução tamponante PBS contendo NHS (5×10^{-2} mol/L) e EDC (0,2 mol/L) para ativar os grupos carboxílicos terminais. Passado o tempo de incubação, as SEF *tags* foram lavadas 3 vezes com tampão PBS, adicionadas a 1,0 mL de solução tamponante PBS de anticorpo policlonal IgM (2×10^{-4} g/mL) e incubadas novamente durante a noite (20 horas) a 10 °C. Anticorpos policlonais IgM (pAb) não ligados foram removidos com lavagem (3 vezes) em tampão PBS e centrifugação a 1500g por 10 minutos. As SEF *tags* resultantes (SEF *tags* - pAb) foram redispersas em 200 μ L de tampão PBS para uso posterior. A Figura 21a exibe uma ilustração das SEF *tags* conjugadas com os anticorpos policlonais IgM (SEF *tag* - pAb). O mesmo procedimento experimental foi

aplicado na conjugação das SERS *tags* com anticorpos monoclonais da Zika NS1 (Zika-mAb).

3.8.3. Conjugação de anticorpos IgM e Zika NS1 em substratos

Anticorpos monoclonais IgM (mAb) foram imobilizados sobre substratos conforme procedimento descrito por Li et al.⁴³ Substratos com dimensões de 25 mm de comprimento por 18 mm de largura e 1 mm de espessura foram limpos por sonificação em água ultrapura (3 vezes) e em etanol (1 vez), durante 10 minutos cada. Os substratos foram então incubados, durante a noite (18 horas) e a temperatura ambiente, em TEPSA (solução etanólica, 0,1 mol/L), seguido de lavagem com etanol (3 vezes) e tampão PBS (3 vezes) a fim de modificar a superfície dos substratos com grupos carboxílicos. Os grupos carboxílicos foram ativados incubando os substratos em solução tamponante PBS contendo NHS (5×10^{-2} mol/L) e EDC (0,2 mol/L) por 2 horas a temperatura ambiente. Passado o tempo de incubação, os substratos foram lavados (3 vezes) com tampão PBS e máscaras de polidimetilsiloxano (PDMS) contendo pequenos poços perfurados (5 mm de diâmetro) foram seladas sobre os substratos para pré-definição das regiões de imunoensaio. As regiões de imunoensaio foram incubadas, durante a noite (20 horas) a 10 °C, em solução tamponante PBS do anticorpo monoclonal IgM (2×10^{-4} g/mL). Anticorpos adsorvidos não especificamente foram minimizados incubando os poços pré-definidos em solução tamponante PBS de leite desnatado 1%, por 2 horas a 10 °C, seguido das etapas de lavagem com tampão PBS (3 vezes). Também foram realizados experimentos com albumina de soro bovino (BSA), como agente bloqueador, mas o leite desnatado em pó proporcionou um melhor desempenho para este ensaio específico. Um esquema ilustrativo da modificação dos substratos com anticorpos monoclonais IgM (mAb - substrato modificado) é mostrado na Figura 21b. Os

anticorpos monoclonais Zika NS1 (Zika-mAb) também foram imobilizados sobre substratos conforme procedimento descrito acima.

3.8.4. Imunoensaio SEF para detecção do antígeno IgM e SERS para detecção do antígeno do vírus da Zika

Diferentes concentrações do antígeno IgM foram selecionadas para preparação em tampão PBS: 10 ng/mL, 100 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 5 µg/mL, 15 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Esses valores estão dentro do intervalo de concentração clinicamente relevante para a detecção de IgM em kits de diagnóstico regular de doenças infecciosas.^{111,112} A montagem da plataforma de imunoensaio SEF se deu a partir da adição de 10 µL de cada concentração do antígeno IgM nas correspondentes regiões pré-definidas de imunoensaio e incubação por 1 hora a 10 °C. Após esse tempo, as regiões de imunoensaio foram cuidadosamente lavadas com tampão PBS (3 vezes) a fim de remover qualquer antígeno não ligado aos anticorpos presentes na plataforma de imunoensaio. Esta etapa de adição e incubação das diferentes concentração do antígeno IgM na plataforma de imunoensaio SEF está ilustrada na Figura 14c. Em seguida, 10 µL de SEF tags - pAb foram adicionados nas correspondentes regiões de imunoensaio e incubadas por mais 1 hora a 10 °C, seguida das etapas de lavagem com tampão PBS (3 vezes) para posterior realização das medidas de SEF. Na Figura 21d tem-se uma representação esquemática da plataforma de imunoensaio SEF e das medidas com o laser em 633 nm.

A plataforma de imunoensaio SERS para detecção do antígeno do vírus da Zika também foi preparada conforme descrito acima. No entanto, no caso do vírus da Zika a faixa de concentração analisada foi de 10 ng/mL a 50 µg/mL, valores estes que também representam relevância clínica para o diagnóstico do vírus da Zika.^{111,112} Além disso, a reatividade cruzada (do inglês, *cross-reactivity*) do sistema foi testada com uma concentração de antígeno da Dengue NS1 de 50 µg/mL. Um esquema da plataforma de

imunoensaio SERS para a detecção dos antígenos do vírus da Zika (ZIKV NS1) está apresentado na Figura 22.

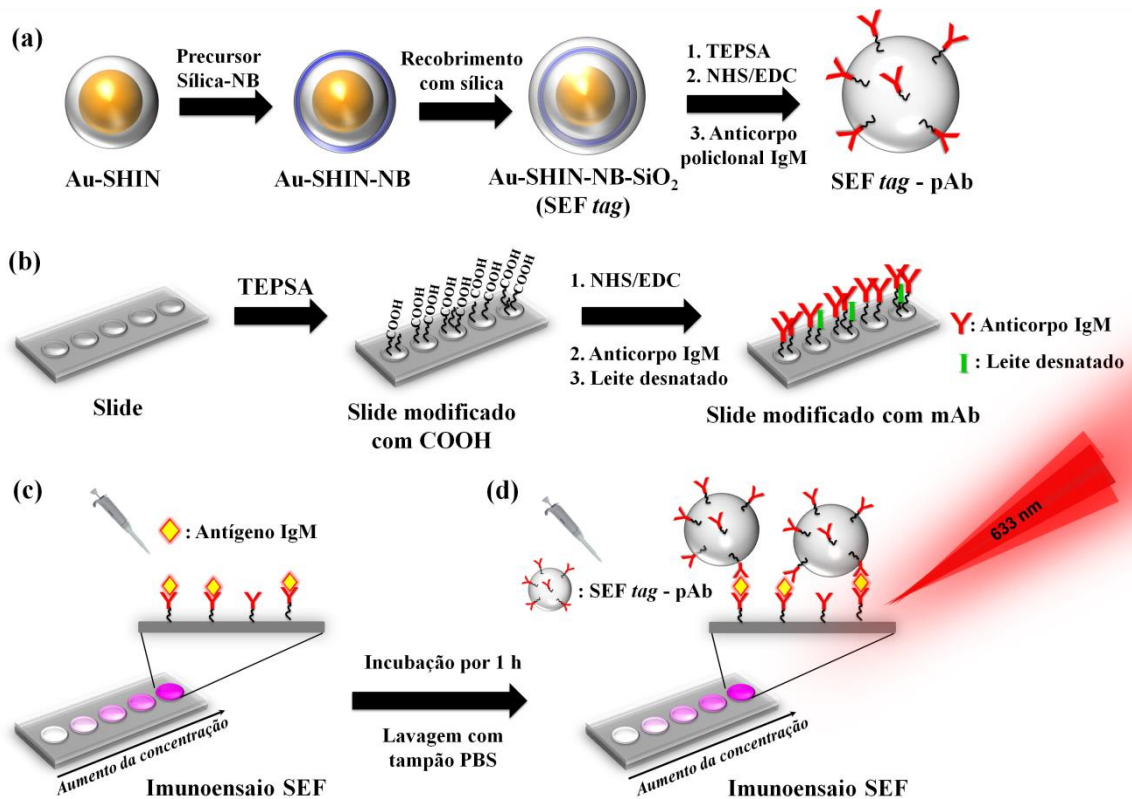


Figura 21: ilustração esquemática de (a) preparação da SEF tag - pAb: Au-SHINS (~ 100 nm + 10 nm de espessura de recobrimento com sílica); Au-SHINS + uma camada fluorescente de NB; Au-SHINS + uma camada fluorescente de NB + ~ 5 nm de recobrimento final com sílica (SEF tag); e conjugação com anticorpo policlonal IgM (SEF tag - pAb). (b) Substrato conjugado com anticorpos monoclonais IgM: incubação com TEPSA para modificar a superfície do substrato com grupos COOH; imersão em NHS/EDC a fim de ativar os grupos COOH para ligarem-se aos grupos amino dos antígenos IgM; incubação com anticorpos monoclonais IgM (mAb); e incubação com leite desnatado para minimizar anticorpos adsorvidos não especificamente. (c) diferentes concentrações do antígeno IgM adicionadas nas correspondentes regiões da plataforma de imunoensaio, incubadas por 1 hora, e lavadas com tampão PBS. (d) Imunoensaio SEF: SEF tags - pAb adicionadas as respectivas regiões de imunoensaio, incubadas por 1 hora, lavadas com tampão PBS, e realização das medidas com linha de laser de excitação de 633 nm. Em cada etapa do procedimento experimental foram feitas lavagem com tampão PBS (mínimo de 3 vezes).

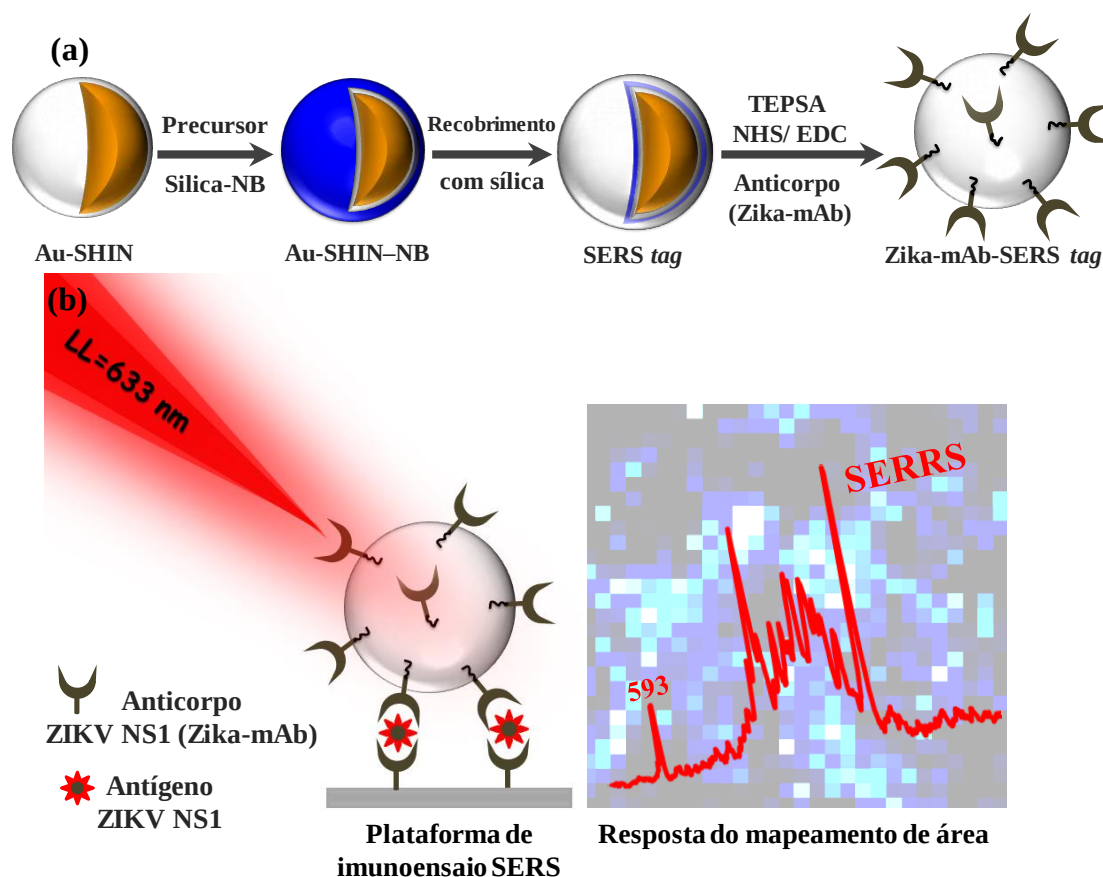


Figura 22: ilustração esquemática da (a) montagem da Zika-mAb-SERS tag: Au-SHIN (AuNP $\sim 100 \text{ nm}$ + 4 nm de espessura de recobrimento com sílica); Au-SHIN + uma camada de NB; Au-SHIN + NB uma camada de NB + $\sim 10 \text{ nm} \sim 5 \text{ nm}$ de recobrimento final com sílica (SERS tag); conjugação com anticorpo monoclonal Zika NS1 (Zika-mAb). (b) Plataforma de imunoensaio SERS para detecção de diferentes concentrações do antígeno da Zika NS1. A plataforma é irradiada com linha de laser em 633 nm e o sinal SERRS das moléculas do NB, localizadas a uma distância muito próxima das nanopartículas de ouro ($\sim 4 \text{ nm}$, apenas uma camada ultrafina de sílica separa as AuNPs das moléculas de NB), é coletado por mapeamento de área.

3.9. Técnicas de caracterização

O número de camadas depositadas e o tipo de substrato utilizado para ambas as técnicas de fabricação de filmes finos (LB e LS), foram escolhidos de acordo com a técnica de caracterização. Os filmes foram crescidos em substratos de quartzo para medidas de espectroscopia de extinção no UV-Vis e espectroscopia Raman e em substratos de germânio e espelho de ouro para medidas de FTIR nos modos transmissão e reflexão, respectivamente. Os filmes depositados em substratos de germânio também foram usados para medidas de AFM. Todos os substratos foram limpos previamente

com detergente neutro, sendo extensivamente lavados com água ultrapura seguida de etanol (5 minutos de sonicação), clorofórmio (5 minutos de sonicação) e acetona (5 minutos de sonicação). Este procedimento é suficiente para ativar a superfície do substrato evitando o uso de qualquer outro tratamento mais drástico como a solução piranha (uma mistura de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio). O crescimento dos filmes LB e LS de ZnPPIX-DME, os espectros de extinção da solução de ZnPPIX-DME, dos coloides de AuNPs e Au-SHINs, das SEF *tags* e SERS *tags*, e das soluções de CV e AMT, a deposição das monocamadas LB de ZnPPIX-DME, ZnPPIX-DME+AuNPs, 15CPTCD/AE e EOSDEC, foram monitorados via espectroscopia de extinção no UV-Vis utilizando um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50, de 190 a 1100 nm (Laboratório de filmes nanoestruturados e espectroscopia – Departamento de Física, FCT-Unesp/ Presidente Prudente, SP, Brasil).

Os espectros de Raman, SERS, fluorescência e SEF, e as imagens ópticas foram obtidos utilizando um espectrógrafo micro-Raman Renishaw modelo in-Via (Laboratório de filmes nanoestruturados e espectroscopia – Departamento de Física, FCT-Unesp/ Presidente Prudente, SP, Brasil). O equipamento possui um microscópio ótico Leica cuja lente objetiva de 50x permite coletar espectros com uma resolução espacial de 1 ca. μm^2 , detector CCD, lasers em 514,5; 633 e 785 nm, redes de difração com 1200 e 1800 linhas/mm, polarizadores e base automática de suporte de amostra com movimentação em X, Y e Z para a obtenção de mapeamentos Raman (obtenção de espectros ponto a ponto com resolução espacial de cerca de 1 μm^2). Medidas em sistemas líquidos foram realizadas utilizando uma lente objetiva ($f = 15 \text{ mm}$) com adaptador macro para medidas em cubetas de quartzo. Espectros de fluorescência e SEF registrados a diferentes temperaturas (de $-130 \text{ }^\circ\text{C}$ a $+23 \text{ }^\circ\text{C}$) foram coletados usando uma fase (*stage*) de temperatura da Linkan 600. A aquisição dos dados foi feita via

programa *WIRE 3.4* e o *background* nos espectros SERS foi corrigido usando o programa *GRAMS/AI 9 Academic Lab*, o qual possui uma ferramenta específica para remover qualquer *background*: uma correção de linha de base que pode ser feita escolhendo manualmente o número de pontos ou aplicando uma autoescala. Os espectros também foram analisados via o método de projeção *Interactive Document Map* (IDMAP).¹¹³ Uma técnica útil na visualização de informações, onde os dados de um espaço multidimensional são projetados em um espaço 2D, criando um gráfico com a máxima preservação de similaridade. Detalhes do método podem ser encontrados em Paulovich et al.¹¹⁴

Medidas de FTIR dos filmes LB e LS de ZNPPIX-DME foram realizadas utilizando um espectrômetro Bruker, modelo Tensor 27 com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 128 *scans*, equipado com um detector DTGS (Laboratório de filmes nanoestruturados e espectroscopia – Departamento de Física, FCT-Unesp/ Presidente Prudente, SP, Brasil). Os espectros no modo reflexão foram obtidos com um ângulo de incidência de radiação de 80° usando um acessório Bruker A118. Filmes LB contendo 30 e 50 camadas foram depositados para medidas de FTIR nos modos transmissão e reflexão, respectivamente. No caso dos filmes LS 60 camadas foram depositadas para as mesmas medidas de FTIR.

A morfologia em escala nanométrica dos filmes foi caracterizada utilizando um microscópio AFM Nanosurf, modelo easyScan 2, com uma ponta de nitreto de silício, operando no modo contato (*tapping*) (Laboratório de filmes nanoestruturados e espectroscopia – Departamento de Física, FCT-Unesp/ Presidente Prudente, SP, Brasil). Todas as imagens foram coletadas com alta resolução (512 linhas/scan) a uma taxa de varredura de 0,5 Hz. As imagens foram tratadas usando o programa Gwyddion 2.19 para analisar a altura média e rugosidade (RMS) das imagens topográficas. Imagens de

microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1400, equipado com uma câmera Gatan Orius SC1000 e aceleração de feixe de elétrons de 100 KV. O equipamento possui uma grade de resolução de 0,2 nm e uma faixa de magnificação de x200 a x1200.000 (Nahirney Laboratory – UVic/ Victoria, BC, Canadá). Os diâmetros das nanopartículas e as espessuras dos recobrimentos com sílica foram calculados usando o programa image J[®].

Capítulo 4

4. Crescimento e caracterização de filmes de Langmuir, LB e LS de ZnPPIX-DME

Nesse capítulo é apresentada a fabricação e a caracterização de filmes de Langmuir (monocamada na interface ar/água), filme LB (filme de Langmuir verticalmente transferido da interface ar/água para o substrato) e filme LS (filme de Langmuir horizontalmente transferido da interface ar/água para o substrato) da protoporfirina (IX) dimetil éster de zinco(II). As principais etapas foram: (i) estudar os filmes de Langmuir via isothermas π -A (pressão de superfície vs área molecular média) e imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) a fim de investigar, respectivamente, as interações moleculares envolvidas na monocamada e o estado de agregação das moléculas em nível microscópico; (ii) investigar e comparar os arranjos supramoleculares dos filmes LB e LS via espectroscopias de extinção no UV-Vis, FTIR e micro-Raman, e microscopia AFM.

4.1. Filmes de Langmuir

Filmes de Langmuir de ZnPPIX-DME na interface ar/água ultrapura foram investigados via isothermas π -A. A Figura 23a apresenta uma isoterma do filme de Langmuir de ZnPPIX-DME a uma velocidade de compressão das barreiras de 10 mm/min e a Figura 23b exhibe isothermas π -A obtidas com diferentes velocidades de compressão das barreiras.

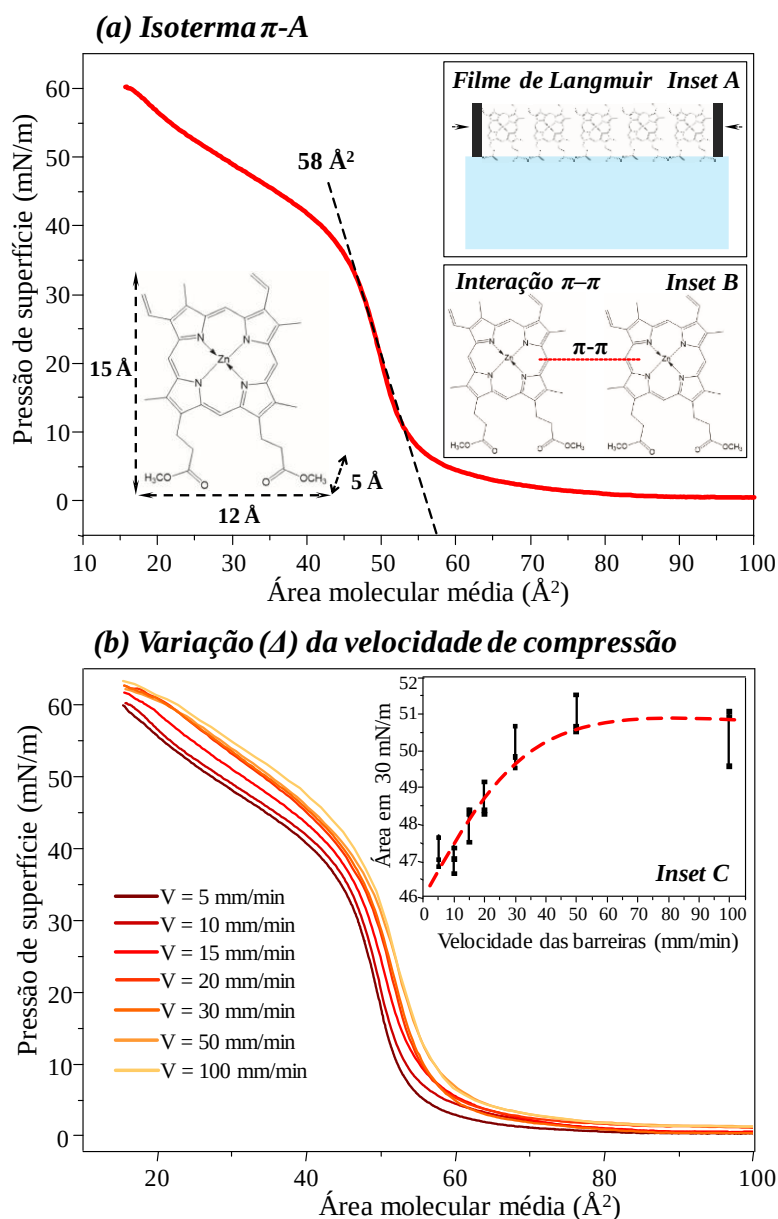


Figura 23: (a) isoterma π -A da ZnPPIX-DME obtida na subfase de água ultrapura a temperatura ambiente (23 °C). O *inset A* é um esquema ilustrativo das moléculas de ZnPPIX-DME na interface ar/água ultrapura do filme de Langmuir e o *inset B* representa as interações π - π entre os anéis da protoporfirina. As dimensões aproximadas da molécula de ZnPPIX-DME são dadas em detalhe. (b) Isothermas π -A de ZnPPIX-DME obtidas para diferentes velocidades de compressão. O *inset C* mostra a dependência da área molecular média em 30 mN/m com a velocidade de compressão (as barras correspondem ao intervalo entre três isothermas registradas para cada velocidade de compressão).

As isothermas π -A obtidas são reprodutíveis (apresentamos apenas uma entre várias), revelando uma boa estabilidade da monocamada, porém não apresentam as fases gasosa, líquida e condensada bem definidas durante a compressão da

monocamada. Ao se aproximar da fase líquida, que se inicia por volta de 10 mN/m, as isotermas π -A exibem uma rápida subida até 35 mN/m. A partir de então, uma fase de transição é observada e um longo processo com uma inclinação menos acentuada ocorre. Borovkov et al.⁶⁴ e Valli et al.⁶⁵ também observaram a mesma transição de fase trabalhando com filmes de Langmuir de bis(profirina de zinco) e porfirina de zinco, respectivamente. Borovkov et al.⁶⁴ atribuíram a existência dessa transição de fase ao aumento de tamanho de agregados tridimensionais. Apesar disso, estas mudanças na pressão de superfície não são suficientes para indicar o colapso da monocamada. De acordo com Bergeron et al.¹¹⁵ não é observada uma mudança significativa na pressão de superfície devido a alta rigidez destes filmes, não sendo possível identificar uma região de colapso.

A área ocupada por molécula de ZnPPIX-DME é estimada como sendo cerca de 58 Å², por extrapolação da região linear da isoterma π -A, antes da transição de fase, até a pressão de zero (Figura 23a). Considerando as dimensões aproximadas das moléculas de ZnPPIX-DME,¹¹⁵ a área molecular da ZnPPIX-DME nos filmes de Langmuir é menor que a área molecular do macrociclo da protoporfirina, se posicionado horizontalmente sobre a interface ar/água (145 Å²). Por outro lado, a área ocupada determinada via isoterma π -A (58 Å²) é comparável ao valor calculado para a ZnPPIX-DME com os grupos ésteres tocando a interface ar/água (12 x 5 = 60 Å² – Figura 23a, *inset A*). Um arranjo molecular semelhante foi encontrado por Jin et al.¹¹⁶ e Li et al.⁶⁶ para filmes de Langmuir de protoporfirinas de ferro(III) e zinco(II), respectivamente. Este possível arranjo molecular, aliado à forte atração da interação π - π entre os anéis da protoporfirina, leva à agregação molecular na interface ar/água,^{66,116} conforme representado pelos *insets A e B* na Figura 23a.

A Figura 23b apresenta o efeito da velocidade de compressão no empacotamento dos filmes de Langmuir. A dependência da área molecular em 30 mN/m com relação a velocidade de compressão é exibida no *inset* C. A área molecular aumenta até um platô conforme a velocidade de compressão aumenta. Tal comportamento está relacionada com o tempo que as moléculas de ZnPPIX-DME têm para se rearranjarem e empacotarem na interface ar/água. Quanto menor a velocidade de compressão, menor a área molecular ocupada pelas moléculas de ZnPPIX-DME, devido a formação de filmes de Langmuir mais empacotados pela forte interação de empilhamento π - π .

Complementando o estudo das isotermas π -A, ciclos de compressão e expansão e imagens de BAM foram obtidas do filme de Langmuir de ZnPPIX-DME. As Figuras 24a e 24b exibem, respectivamente, os 4 ciclos de compressão-expansão e as imagens de BAM.

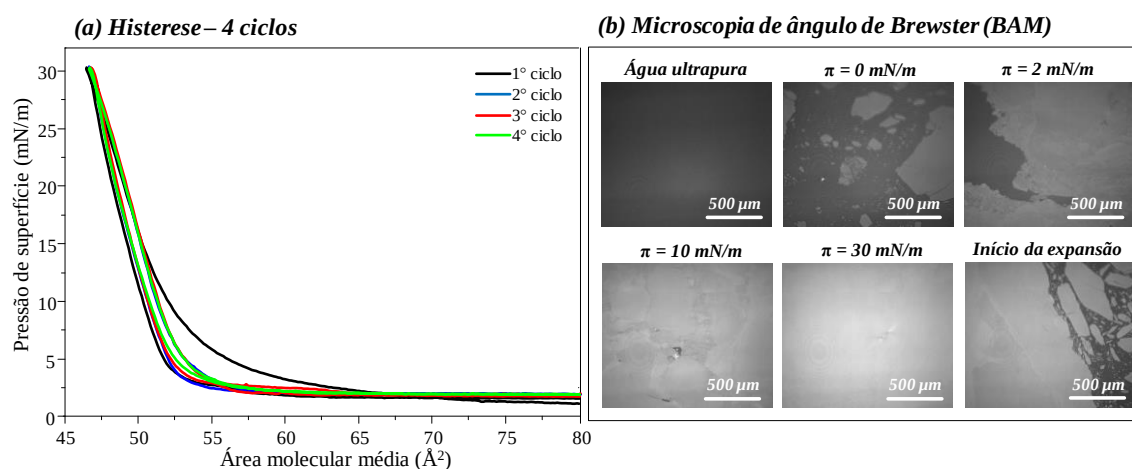


Figura 24: (a) isotermas π -A de ZnPPIX-DME para 4 ciclos consecutivos de compressão-expansão. (b) Imagens de BAM registradas para diferentes estágios de compressão do filme de Langmuir (escala da barra = 500 μ m). O filme foi comprimido até uma pressão de superfície de 30 mN/m (referente a sua fase condensada) com velocidade de compressão das barreiras de 10 mm/min a temperatura ambiente (23 °C).

Analisando as isotermas π -A de compressão-expansão exibidas na Figura 24a é possível observar uma pequena histerese após o primeiro ciclo, o que indica a formação de agregados moleculares durante a primeira compressão. Os ciclos subsequentes

reproduzem uns aos outros sugerindo que os agregados formados como resultado da interação de empilhamento π - π são estáveis, isto é, eles são formados durante a primeira compressão e são mantidos nos ciclos subsequentes. As imagens de BAM (Figura 24b) registradas para diferentes estágios de compressão apresentam domínios significantes mesmo antes de começar a compressão da monocamada ($\pi = 0$ mN/m), o que é uma evidência das interações π - π que conduzem a agregação das moléculas de ZnPPIX-DME. A presença de grandes domínios é ainda predominante na fase gasosa, atingida a baixas pressões de superfície ($\pi = 2$ mN/m) por compressão da monocamada. Borovkov et al.⁶⁴ também observaram a coexistência de domínios nas fases gasosa e condensada em filmes de Langmuir de uma bis(porfirina de zinco) e atribuíram este fato à presença de agregados na superfície da água. O aumento da pressão de superfície para a fase líquida ($\pi = 10$ mN/m) e condensada ($\pi = 30$ mN/m) aumenta a uniformidade da monocamada de Langmuir e grandes domínios não são mais observados. Este é o estágio (chamado de fase sólida) em que a monocamada de Langmuir é transferida para substratos sólidos que formam ambos, filmes LB ou LS. Ao expandir a monocamada de Langmuir, grandes domínios são mais uma vez observados, igualmente à compressão, o que está de acordo com a estabilidade da agregação observada nos ciclos de compressão-expansão das isothermas π -A (histerese).

4.2. Crescimento dos filmes LB e LS monitorados via extinção no ultravioleta-visível (UV-Vis)

O crescimento dos filmes LB e LS de ZNPPIX-DME foi monitorado via espectroscopia de extinção no UV-Vis. As Figuras 25a e 25b exibem os espectros de extinção registrados de 1 a 9 monocamadas para o crescimento dos filmes LB e LS, respectivamente.

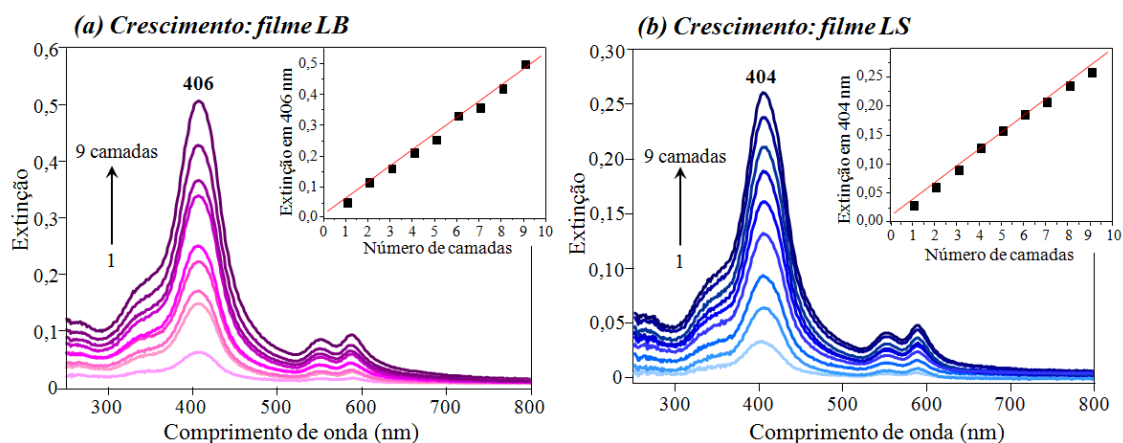


Figura 25: espectros de extinção para os filmes (a) LB e (b) LS contendo diferentes números de monocamadas de ZnPPIX-DME. Os filmes foram crescidos sobre substrato de quartzo a uma pressão de superfície constante em 30 mN/m sob subfase de água ultrapura a temperatura ambiente (23 °C). Os *insets* exibem a dependência linear da extinção em função do número de monocamadas depositadas.

Os espectros de extinção dos filmes LB e LS exibem três bandas principais com máximos em 406, 550 e 587 nm para o filme LB e 404, 550 e 589 nm para o filme LS. A banda de maior intensidade, conhecida como banda de Soret,^{66,115} é atribuída a transições π - π^* (do estado fundamental para o segundo estado eletrônico excitado, $S_0 \rightarrow S_2$)¹¹⁷ devido à alta conjugação do centro porfirínico. As duas demais bandas, de menor intensidade, conhecidas como bandas Q,^{66,115} são atribuídas a transições π - π^* e n - π^* de elétrons mais externos (do estado fundamental para os níveis vibracionais Q_α ($0 \leftarrow 0$) e Q_β ($1 \leftarrow 0$))¹¹⁵ do primeiro estado eletrônico excitado, $S_0 \rightarrow S_1$).¹¹⁷

Os *insets* nas Figuras 25a e 25b apresentam a extinção em 406 e 404 nm em função dos diferentes números de camadas depositadas nos filmes LB e LS, respectivamente. O crescimento linear da extinção indica que quantidades semelhantes de ZnPPIX-DME são transferidas por monocamada depositada, revelando um crescimento controlado em ambos os filmes, LB e LS. Além disso, em termos de valores de extinção, considerando que no filme LB as monocamadas são transferidas em ambos os lados do substrato, enquanto no filme LS as monocamadas são transferidas

apenas em um lado do substrato, pode-se concluir que aproximadamente a mesma quantidade de ZnPPIX-DME é depositada por monocamada para ambos os filmes.

Complementarmente à discussão realizada sobre o crescimento dos filmes LB e LS, um espectro de extinção no UV-Vis foi obtido para a solução de ZnPPIX-DME utilizada na fabricação dos filmes. A Figura 26 exibe a extinção eletrônica para os filmes LB e LS (9 monocamadas) e para a solução de ZnPPIX-DME. Os espectros estão plotados fora de escala no eixo y (extinção) para que se compare somente os picos de extinção no eixo x (comprimento de onda).

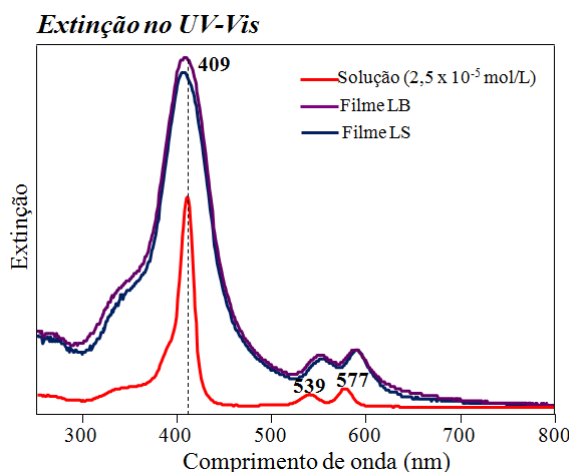


Figura 26: espectros de extinção no UV-Vis para a solução de ZnPPIX-DME ($2,5 \times 10^{-5}$ mol/L) e os filmes LB e LS contendo 9 monocamadas. As curvas estão plotadas fora de escala no eixo y para uma comparação dos picos de extinção no comprimento de onda.

Os deslocamentos observados na banda de Soret e nas bandas Q, quando comparados os espectros de extinção no UV-Vis dos filmes com o espectro da solução (Figura 26), são atribuídos à formação de agregados e podem ser explicados segundo a Teoria dos Éxcitons.^{118,119} A Teoria dos Éxcitons baseia-se nas interações do momento dipolo-dipolo entre dois centros moleculares e prevê uma divisão do primeiro estado excitado E_e de uma molécula em dois estados excitados para um dímero (duas moléculas interagindo entre si): um estado de menor energia (E_1) e outro de maior

energia (E_2). O momento de transição a partir do estado fundamental para estes dois estados eletrônicos excitados é descrito como um vetor adicional da transição individual de cada monômero e está experimentalmente correlacionado com a possibilidade de ocorrer a absorção eletrônica.¹¹⁸ Dependendo do arranjo espacial das moléculas nos agregados, podemos observar diferentes características espectroscópicas, como os deslocamentos das bandas de extinção para valores de maior ou menor energia. Baseado na Teoria dos Éxcitons, Kasha et al.¹¹⁹ propuseram um modelo para explicar tais deslocamentos de energia a partir da formação de agregados J ou H em função do ângulo (α) entre os dipolos eletrônicos e do eixo molecular do agregado. A Figura 27 ilustra dois acoplamentos entre as duas moléculas que formam o dímero, gerando agregados J e H.

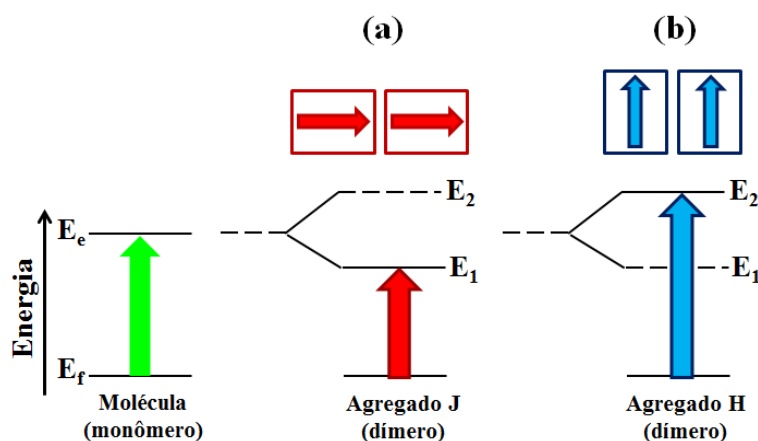


Figura 27: representação dos deslocamentos de energia das transições eletrônicas do estado fundamental (E_f) para os estados excitados (E_1 e E_2) para os agregados moleculares (a) J e (b) H e disposição dos momentos de dipolo dos respectivos agregados.

Como ilustrado na Figura 27, os agregados J se caracterizam por um deslocamento para o vermelho (batocrômico) em comparação com a banda de extinção do monômero e podem gerar geometrias cabeça-cauda (do inglês, *head-to-tail*). Por outro lado, os agregados H apresentam um deslocamento para o azul (hipsocrômico) e podem gerar geometrias lado-a-lado (do inglês, *side-by-side*), estando as moléculas

dispostas paralelamente umas em relação às outras.¹¹⁹ No caso dos filmes LB e LS, a banda de Soret apresenta deslocamento para o azul quando comparada ao monômero (espectro da solução), sugerindo a formação de agregados H. Enquanto, as bandas Q apresentam deslocamentos para o vermelho, caracterizando a formação de agregados J. Li et al.⁶⁶ observaram deslocamento similar da banda de Soret para o azul em filmes LB de protoporfirina IX de zinco(II) e atribuíram a formação de agregados H. Além disso, de acordo com a teoria de acoplamento dos éxcitons de transições eletrônicas em sistemas π porfirínicos,¹²⁰ o deslocamento da banda de Soret para o azul sugere um empilhamento paralelo dos macrociclos, gerando agregados H. Por outro lado, Gong et al.,¹²¹ trabalhando com porfirinas de ferro(III), verificaram o alargamento e separação da banda de Soret, além do deslocamento das bandas Q para o vermelho, e atribuíram tais mudanças à existência de ambos agregados H e J. Embora no caso dos filmes LB e LS não tenha ocorrido a separação da banda de Soret, os deslocamentos observados na banda de Soret e nas bandas Q sugerem a presença de ambos agregados H e J, respectivamente, nesses filmes.

Analisando os espectros de extinção dos filmes LB e LS, observa-se ainda o alargamento da banda de Soret e das bandas Q quando comparados com o espectro da solução. A Tabela 1 apresenta os valores de largura à meia altura calculada para as bandas de Soret e Q nos espectros da solução e dos filmes LB e LS. Tal aumento é um indicativo da maior agregação das moléculas de ZnPPiX-DME nos filmes em relação à solução. Li et al.⁶⁶ também observaram o alargamento da banda de Soret quando comparado o espectro de extinção de um filme LB de ZnPP com o espectro da solução e atribuíram tal comportamento à presença de agregados no filme.

Tabela 1: largura à meia altura (FWHM, *full width at half maximum*) para as bandas de Soret e Q nos espectros de extinção da solução e dos filmes LB e LS de ZnPPIX-DME

Largura à meia altura (FWHM) em nm e em eV		
	Banda de Soret	Bandas Q
Solução ($2,5 \times 10^{-5}$ mol/L)	105,2 nm/ 11,8 eV	42,8 nm/ 29,0 eV
Filme LB	112,7 nm/ 11,0 eV	57,4 nm/ 21,6 eV
Filme LS	114,3 nm/ 10,8 eV	57,0 nm/ 21,8 eV

4.3. Morfologia dos filmes LB e LS em escalas micro e nanométrica

A distribuição espacial da ZnPPIX-DME nos filmes LB e LS com resolução em escala micrométrica foi analisada utilizando a técnica de micro-Raman, a qual combina informação morfológica e química com um microscópio óptico acoplado ao espectrógrafo Raman. As Figuras 28a e 28b exibem os espectros Raman e as imagens ópticas para os filmes LB e LS de ZnPPIX-DME, respectivamente. As atribuições das principais bandas Raman da ZnPPIX-DME nos filmes LB e LS são dadas na Tabela 2.

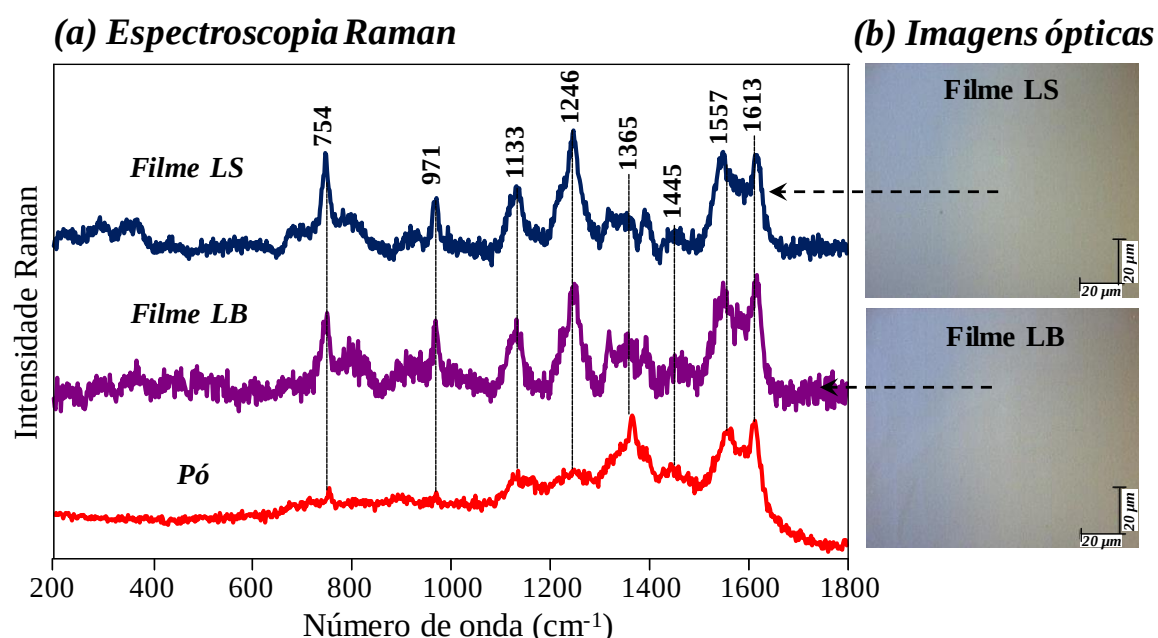


Figura 28: espectros Raman dos filmes LB e LS de ZnPPIX-DME (9 camadas cada) obtidos com linha de laser em 633 nm, potência de 10% em relação a 17 mW, 1 acumulação e tempo de aquisição de 10 s. O espectro do pó foi obtido com laser em 514,5 nm, potência de 10% em relação a 48,5 mW, e mesmas condições de acumulação e tempo. (b) Imagens ópticas (500x, escala da barra = 20 μ m) para os filmes LB e LS.

Tabela 2: atribuições das bandas Raman da ZnPPIX-DME no pó e nos filmes LB e LS.

Pó (cm ⁻¹)	Filme LB (cm ⁻¹)	Filme LS (cm ⁻¹)	Atribuição
754	752	748	C–H <i>wagging</i> ¹²²
971	969	970	Estiramento C _α –C _β ou C _α –C _m do macrociclo porfirínico ¹²³
1133	1132	1131	Estiramento C–O ¹²²
1246	1247	1247	Estiramento do grupo éster ¹²²
1365	1358	1356	Estiramento simétrico COO ⁻ sobreposto ao CH ₂ <i>scissoring</i> ^{122,124}
1445	1455	1452	CH ₂ <i>scissoring</i> ^{122,124}
1557	1549	1549	Estiramento C _β –C _β do esqueleto porfirínico ¹²³
1613	1618	1617	Estiramento antissimétrico COO ⁻ ¹²²

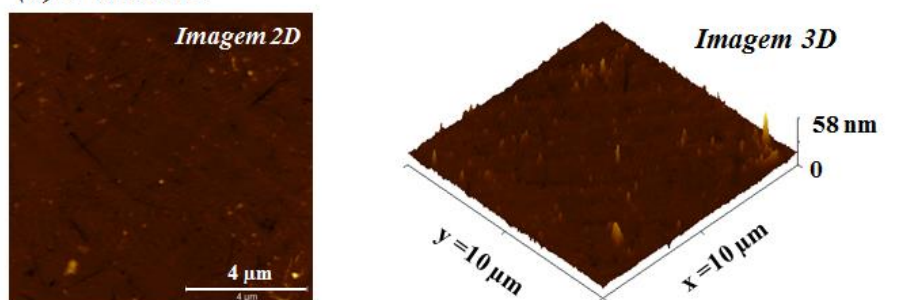
As imagens ópticas dos filmes LB e LS (Figura 28b) revelam uma alta homogeneidade na superfície em escala micrométrica, similar ao observado via BAM para a fase condensada do filme de Langmuir. Em termos de intensidade relativa das bandas, poucas diferenças são encontradas nos espectros para os filmes LB e LS. As imagens BAM (Figura 24b) sugerem que os filmes de Langmuir são formados por domínios que podem conter diferente estruturação das moléculas de ZnPPIX-DME. Nos experimentos de micro-Raman, a área examinada pelo laser é cerca de 1 μm². Portanto, essas diferenças nos espectros Raman para os filmes LB e LS podem estar relacionadas a diferentes pontos do filme atingidos pelo laser, contendo domínios com estruturação distinta das moléculas de ZnPPIX-DME. Este efeito não é observado com técnicas como FTIR e UV-Vis, pois nestas técnicas a área atingida pelo feixe de radiação é de cerca de mm². Os espectros coletados nestes casos são uma média das respostas combinadas dos diferentes domínios, conduzindo a uma menor variação.

Em termos de morfologia em escala nanométrica, as Figuras 29a e 29b apresentam imagens AFM (2 e 3 dimensões, respectivamente) para os filmes LB e LS

de ZnPPIX-DME contendo 9 camadas. Complementarmente, as imagens de AFM foram caracterizadas via rugosidade (RMS, do inglês *root mean square*) e altura média (diferença de altura entre picos e vales). A rugosidade RMS é dada pelo desvio padrão de acordo com a equação $R_{rms} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (Z_n - \bar{Z})^2}{N-1}}$ onde $\bar{Z}$ é a média dos valores de Z dentro da área determinada, Z_n é a altura do n -ésimo pixel e N é o número de pixels considerado, enquanto a altura média é simplesmente a média aritmética das alturas medidas. Os valores de rugosidade e altura média foram obtidos para áreas de 30 μm x 30 μm , 20 μm x 20 μm e 10 μm x 10 μm e estão apresentados na Tabela 3. Os baixos valores em termos de rugosidade e altura média apresentada pelo próprio substrato de quartzo (Tabela 3) asseguram uma maior precisão nos resultados obtidos para os filmes.

Uma inspeção visual das imagens de AFM, Figura 29, mostra a presença de alguns pontos distribuídos ao longo das superfícies dos filmes (LB e LS), revelando que o padrão morfológico homogêneo observado em escala micrométrica através de micro-Raman é bastante diferente em escala nanométrica. Esses pontos podem ser responsáveis pelos altos valores relativos de rugosidade (RMS) e altura média e pelas diferenças encontradas para estes valores, dependendo do tamanho das áreas verificadas (Tabela 3). A rugosidade (RMS), por exemplo, é cerca de 10 a 20% da espessura dos filmes (Figura 29). A principal diferença é a superfície mais rugosa exibida pelo filme LB comparado ao filme LS. Li et al.⁶⁶ trabalhando com filmes LB puros e mistos de protoporfirina IX de zinco(II) (ZnPP) e surfactantes observaram características semelhantes em termos de topografia dos filmes.

(a) Filme LB



(b) Filme LS

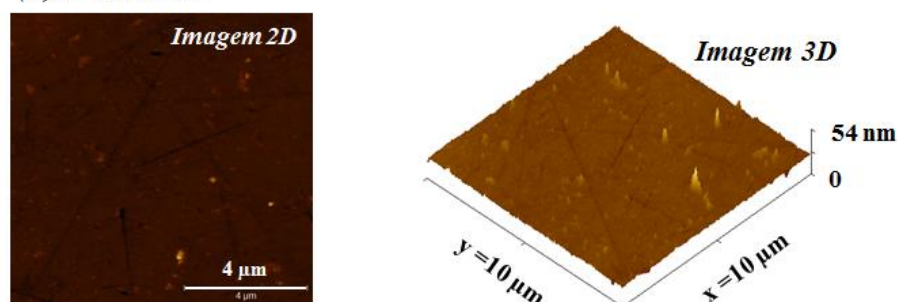


Figura 29: imagens topográficas de AFM em 2 e 3 dimensões para 9 camadas dos filmes (a) LB e (b) LS de ZnPPIX-DME.

Tabela 3: rugosidade (RMS) e altura média para os filmes LB e LS de ZnPPIX-DME.

Amostra	Área (μm^2)	Rugosidade (nm)	Altura média (nm)
Filme LB	30 x 30	2,8	1,6
	20 x 20	2,6	1,6
	10 x 10	2,3	1,5
Filme LS	30 x 30	2,1	1,3
	20 x 20	1,9	1,3
	10 x 10	1,4	1,1
Substrato de quartzo	30 x 30	0,8	1,0
	20 x 20	0,4	0,8
	10 x 10	0,3	0,7

A espessura dos filmes também foi verificada por AFM. As Figuras 30a e 30b mostram um perfil de superfície produzido pela remoção de material com uma agulha nos filmes LB e LS depositados sobre placa de germânio. A placa de germânio foi

utilizada neste caso porque o contraste permite encontrar mais facilmente a borda dos filmes.

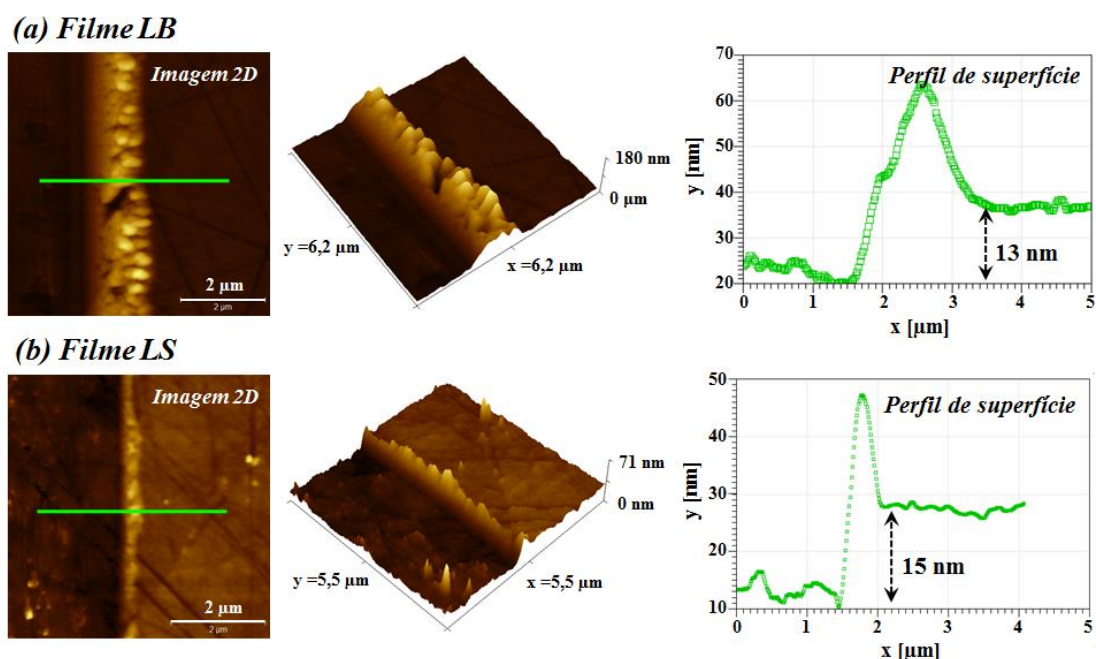


Figura 30: imagens topográficas de AFM mostrando o perfil ao longo de um degrau feito pela remoção de material com uma agulha nos filmes (a) LB e (b) LS de ZnPPIX-DME contendo 9 camadas cada.

Os filmes LB e LS de ZnPPIX-DME mostraram uma espessura de 13 e 15 nm, respectivamente, para 9 camadas em ambos os casos, o que conduz a uma espessura de aproximadamente 1,4 e 1,6 nm por camada, respectivamente. Considerando as dimensões da molécula de ZnPPIX-DME (altura = 1,5 nm) e sua disposição na interface ar/água proposta na Figura 23a, pode-se inferir que, apesar da formação de agregados moleculares, cada monocamada formando os filmes LB ou LS possui a espessura de aproximadamente uma molécula. A espessura equivalente dos filmes LB e LS está de acordo com os dados de espectroscopia de extinção no UV-Vis, que também demonstraram uma extinção equivalente de ZnPPIX-DME por camada.

4.4. Organização molecular dos filmes LB e LS via FTIR

Medidas de FTIR nos modos de transmissão e reflexão foram realizadas a fim de verificar uma possível anisotropia em termos de organização molecular da ZnPPIX-DME nos filmes LB e LS. Uma orientação molecular específica pode ser determinada combinando-se os dados de FTIR com as regras de seleção de superfície,^{125–127} onde: (i) a intensidade da absorção no infravermelho (I) para uma dada molécula depende do produto escalar entre o campo elétrico da radiação incidente ($\vec{E}$) e a variação do momento de dipolo ($\vec{\mu}$) de cada modo vibracional da molécula. Em outras palavras, $I = \vec{E} \cdot \vec{\mu} \cdot \cos \theta$; (ii) para a absorção no modo de transmissão, o campo elétrico incidente é paralelo ao plano do substrato e para o modo de reflexão o campo elétrico incidente é perpendicular ao plano do substrato, conforme ilustrado na Figura 31.

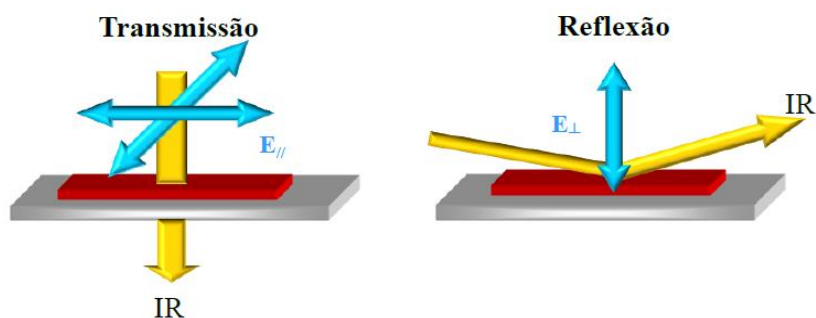


Figura 31: ilustração da direção da radiação incidente e do campo elétrico incidente nas medidas de FTIR para os modos de transmissão e reflexão, respectivamente.¹²⁸

Quando o campo elétrico está paralelo ao momento dipolo de um determinado modo vibracional molecular ($\vec{E} // \vec{\mu}$), $\cos 0 = 1$ (ou $\cos 180^\circ = -1$) e, portanto, $I = \vec{E} \cdot \vec{\mu}$; a intensidade de absorção será máxima (em módulo). No entanto, quando o campo elétrico está perpendicular ao momento dipolo da vibração ($\vec{E} \perp \vec{\mu}$), $\cos 90^\circ = 0$ e, portanto, $I = 0$; a intensidade de absorção será nula, e na prática esse modo vibracional não é identificado no espectro FTIR. Portanto, conhecendo-se a direção do campo elétrico incidente na amostra para os modos de transmissão e reflexão e as componentes

$\vec{\mu}$ de algumas bandas, tem-se que modos vibracionais paralelos ao plano do substrato terão amplitudes vibracionais máximas no modo transmissão e nulas no modo reflexão. Da mesma forma, modos vibracionais perpendiculares ao plano do substrato terão amplitudes vibracionais máximas no modo de reflexão e nulas no modo de transmissão.

As Figuras 32a e 32b exibem espectros FTIR nos modos de transmissão e reflexão dos filmes LB e LS da ZnPPIX-DME, respectivamente. O espectro FTIR no modo de transmissão do pó da ZnPPIX-DME disperso numa pastilha de KBr é apresentado como referência para uma orientação molecular aleatória. As atribuições das principais bandas vibracionais da ZnPPIX-DME são dadas na Tabela 4.

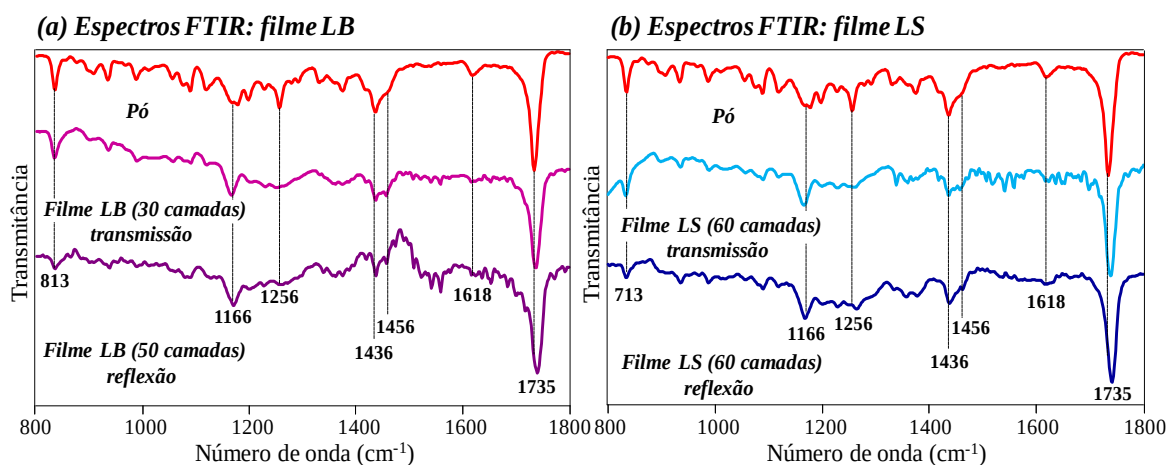


Figura 32: espectros FTIR obtidos para o pó da ZnPPIX-DME dispersa em pastilha de KBr e para os filmes (a) LB e (b) LS depositados sobre substrato de germânio (modo de transmissão) e espelho de ouro (modo de reflexão).

Tabela 4: atribuições das principais bandas FTIR da ZnPPIX-DME.

ZnPPIX-DME pó (cm ⁻¹)	Atribuição
813	C-H <i>wagging</i> ¹⁵
1166	Estiramento C-O ¹⁵
1256	Estiramento do grupo éster ¹⁵
1436	Deformação CH ₂ ^{15,17}
1456	CH ₂ <i>scissoring</i> ^{15,17}
1618	Estiramento antissimétrico COO ⁻ ¹⁵
1735	Estiramento C=O ¹⁵

Pequenas diferenças são observadas quando os espectros de transmissão e reflexão dos filmes LB e LS da ZnPPIX-DME são comparados entre si. Além disso, os espectros dos filmes são bastante semelhantes aos do pó, sugerindo uma isotropia das moléculas de ZnPPIX-DME, ou seja, uma falta de organização molecular preferencial em ambos os filmes, LB e LS. Em um levantamento bibliográfico não foi encontrado a combinação de medidas de FTIR, nos modos de transmissão e reflexão, para determinar-se a anisotropia de filmes LB de protoporfirinas. Facci et al.¹²⁹ investigaram a anisotropia molecular de porfirinas de zinco octaésteres mesogênicas em filmes LB através de espectroscopia de absorção óptica com luz polarizada e não polarizada e espectroscopia de absorção no infravermelho, acompanhando a banda de Soret e a banda de estiramento C–H, respectivamente. A primeira técnica foi aplicada para filmes LB depositados em diferentes pressões de superfície, onde foi possível encontrar ângulos de inclinação de 40-45° para os macrociclos porfirínicos nas monocamadas LB. Em nosso caso, considerando as regras de seleção de superfície aplicadas no FTIR, o fato dos espectros de transmissão e reflexão serem bastante parecidos poderia sugerir orientações moleculares de 45° para ambos os filmes, LB e LS. No entanto, tal suspeita não se aplica, uma vez que ao compararmos tais espectros com o pó (cuja orientação é aleatória) observamos um perfil espectral bastante semelhante.

Capítulo 5

5. Codeposição de AuNPs e ZnPPIX-DME via técnica de Langmuir-Blodgett (LB)

Esse capítulo apresenta o desenvolvimento de uma estratégia baseada na codeposição de ambas, nanopartículas de ouro (AuNPs) e protoporfirina (IX) dimetil éster de zinco(II) (ZnPPIX-DME) via filme LB, direcionado para obtenção do efeito SERS. Além do objetivo principal, que é a codeposição de ZnPPIX-DME+AuNPs, têm-se como objetivos: (i) investigar a interação entre as AuNPs e as moléculas de ZnPPIX-DME via isothermas de Langmuir (pressão de superfície vs área molecular média) contendo AuNPs na subfase; (ii) monitorar a extinção de *plasmon* do coloide de AuNPs e a codeposição do filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs via espectroscopia de extinção; (iii) investigar a morfologia em escala micro e nanométrica via micro-Raman e AFM e (iv) examinar a distribuição espacial das AuNPs e ZnPPIX-DME no filme LB via mapeamento SERS.

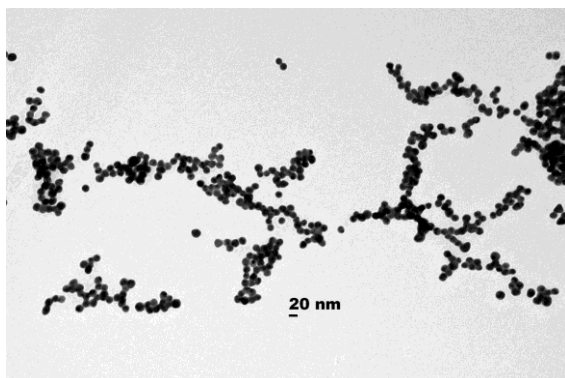
5.1. Filmes de Langmuir de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs

Nas Figuras 33a e 33b tem-se a caracterização morfológica do coloide de AuNPs, utilizado na fabricação do filme de ZnPPIX-DME+AuNPs, via imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e histograma de determinação do diâmetro médio das AuNPs.

A imagem de MET, mostrada na Figura 33a, confirma uma morfologia predominantemente esférica das AuNPs. Além disso, pelo histograma (Figura 33b) construído a partir da imagem de MET determinou-se o diâmetro médio das NPs como sendo $15,9 \pm 1,4$ nm. Aroca et al.¹⁰ e Grabar et al.¹⁰⁹ reportaram a preparação de AuNPs com diâmetros médios de 13 e 16 nm, respectivamente, a partir da mesma rota sintética. Portanto, os valores determinados em nosso histograma estão coerentes com os valores

reportados na literatura. Turkevich et al.,¹³⁰ pioneiros no método de preparação de coloides de Au via redução com citrato, obtiveram NPs com diâmetro médio de 16,5 nm e desvio padrão de 8,1 %. Em nosso caso, esse desvio representa 8,8 % do diâmetro médio. Se comparado ao valor encontrado por Turkevich et al.,¹³⁰ tal desvio ainda é pequeno o suficiente para considerarmos uma distribuição monodispersa das AuNPs.

(a) Imagem de MET



(b) Histograma – diâmetro das NPs

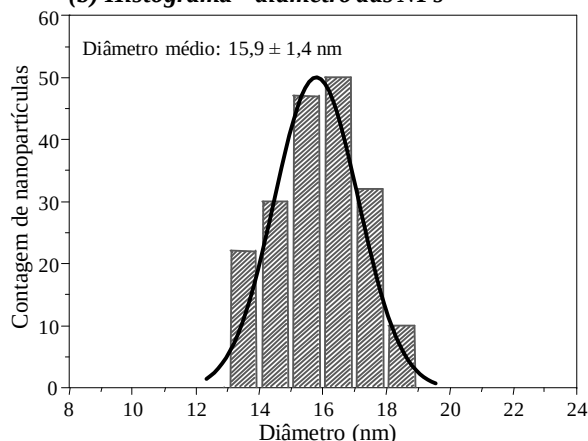


Figura 33: (a) imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do coloide de AuNPs preparado via redução com citrato de sódio. (b) Histograma construído a partir da imagem (a) para determinar o diâmetro médio das AuNPs.

Isotermas π -A de filmes de Langmuir de ZnPPIX-DME na interface ar/água, obtidas com subfase contendo água ultrapura ou coloide de AuNPs, são dadas na Figura 34a. Na Figura 34b tem-se a elasticidade das monocamadas, avaliada via módulo de compressão de superfície (C_s^{-1}), ou elasticidade no plano.

As isotermas π -A para subfases contendo água ultrapura (ZnPPIX-DME) ou coloide de AuNPs (ZnPPIX-DME+AuNPs) foram obtidas em triplicata, sendo representada na Figura 34a apenas uma isoterma para cada composição de subfase. A dispersão das isotermas de ZnPPIX-DME+AuNPs é maior do que é observada para as isotermas de ZnPPIX-DME. A fim de melhor exemplificar tais dispersões, tem-se na Figura 35, um conjunto de isotermas para ZnPPIX-DME e para ZnPPIX-DME+AuNPs.

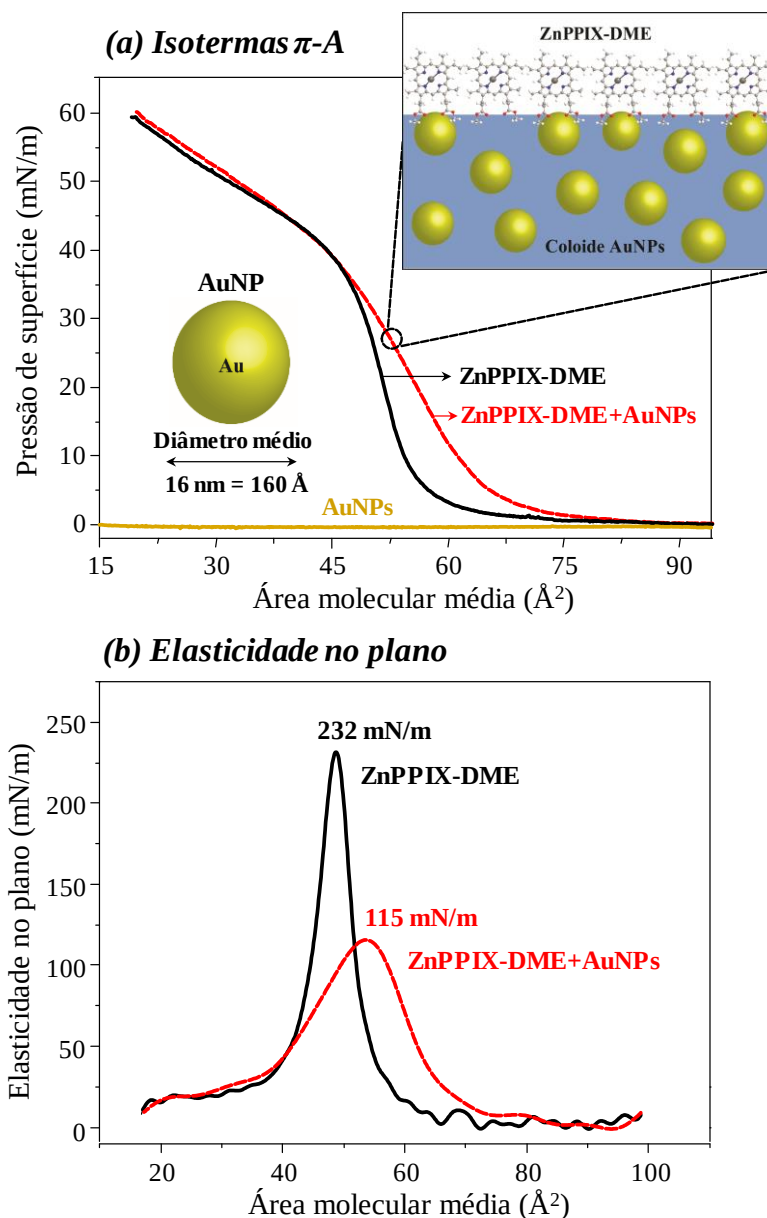


Figura 34: (a) isotermas π -A obtidas para subfases contendo água ultrapura ou coloide de AuNPs e para apenas a suspensão coloidal de AuNPs 16 nm na subfase (AuNPs) a temperatura ambiente (23 °C). O *inset* apresenta um esquema ilustrativo do filme de Langmuir de ZnPPIX-DME na interface ar/água contendo AuNPs na subfase. As dimensões das AuNPs foram determinadas via MET e estão de acordo com Aroca et al.¹⁰ (b) Elasticidade no plano (C_s^{-1}) calculada a partir das isotermas π -A plotadas em (a) usando a expressão: $C_s^{-1} = -A(\partial\pi/\partial A)$.

A presença de AuNPs na subfase induz a um deslocamento da isoterma π -A de ZnPPIX-DME para maiores valores de área molecular média. AuNPs preparadas por redução com citrato têm valores de potencial zeta negativos (carga superficial negativa).¹³¹ A superfície do substrato de quartzo em água tende a ser negativa,¹³²

impedindo a deposição direta das AuNPs sobre o substrato. As moléculas de ZnPPIX-DME contêm grupos ésteres não-ionizáveis de frente para a subfase aquosa.⁶⁶ Portanto, pode-se sugerir uma adsorção física entre os grupos ésteres das moléculas de ZnPPIX-DME e as AuNPs, tal como representado no *inset* da Figura 34a. As AuNPs estão inseridas entre as porções ésteres na interface ar/água, induzindo um aumento de área molecular das isotermas π -A. No entanto, essas interações são fracas e as AuNPs são expelidas para fora da interface ar/água em pressões de superfície acima de aproximadamente 35 mN/m. Essa última é destacada pela sobreposição das isotermas de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs a altas pressões de superfície, sugerindo que as interações de empilhamento π - π ⁶⁶ entre as moléculas de ZnPPIX-DME são, provavelmente, mais fortes que as interações entre as AuNPs e as ZnPPIX-DME. O deslocamento observado na isoterma de ZnPPIX-DME em subfase de AuNPs quando comparada a de ZnPIX-DME em subfase de água ultrapura poderia ser um efeito dos reagentes de partida da síntese das AuNPs. No entanto, a compressão das barreiras da cuba de Langmuir quando há apenas AuNPs na subfase (curva amarela) não resulta em isoterma (vide Figura 34a), confirmando que tal deslocamento é uma consequência das interações entre AuNPs e as moléculas de ZnPPIX-DME.

A elasticidade das monocamadas avaliada via módulo de compressão de superfície (C_s^{-1}), ou elasticidade no plano, foi calculada a partir dos dados das isotermas π -A representadas na Figura 34a usando a expressão: $C_s^{-1} = -A(\partial\pi/\partial A)$.¹³³ Essa abordagem é realizada uma vez que a incorporação de AuNPs afeta as propriedades mecânicas das monocamadas. Por exemplo, uma diminuição drástica de elasticidade é vista quando as AuNPs são incorporadas à monocamada de ZnPPIX-DME, como mostrado na Figura 34b. Os máximos valores de elasticidade diminuem de aproximadamente 232 para 115 mN/m, considerando os filmes de Langmuir de

ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs, respectivamente. Além disso, o deslocamento do pico máximo de elasticidade para maiores áreas também reflete a expansão imposta pela incorporação das AuNPs no filme de Langmuir de ZnPPIX-DME. Esse último é também um resultado da interação entre as AuNPs e as moléculas de ZnPPIX-DME, como discutido anteriormente na Figura 34a. Torrano et al.¹³⁴ têm demonstrado a existência de interações eletrostáticas entre AuNPs carregadas e filmes de Langmuir do fosfolípido aniônico DPPG. O efeito é maior para AuNPs carregadas positivamente funcionalizadas com o polieletrólito catiônico polialilamina hidrocloreada (PAH), mas as carregadas negativamente também afetaram as propriedades das monocamadas devido a influência de interações secundárias. Considerando que as moléculas de ZnPPIX-DME não apresentam sítios positivos, interações eletrostáticas não estão evidenciadas em nosso sistema. Assim, as interações secundárias devem desempenhar um papel importante nos filmes de Langmuir de ZnPPIX-DME+AuNPs.

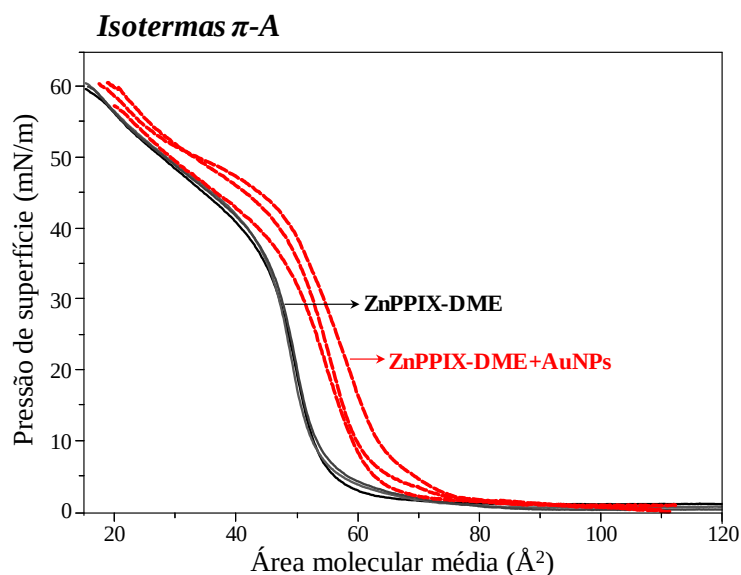


Figura 35: isotermas π -A de ZnPPIX-DME obtidas em triplicata para subfases de água ultrapura (ZnPPIX-DME) ou coloide de AuNPs (ZnPPIX-DME+AuNPs) a 23 °C.

5.2. Filmes LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs

As monocamadas LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs foram depositadas em pressões de superfície constantes a 30 mN/m e 20 mN/m, respectivamente. A esses valores de pressão, os filmes de Langmuir de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs já estão bem empacotados sobre a subfase independente da presença de AuNPs, como mostrado pelas isotermas π -A (Figura 34a). Além disso, no caso do filme de ZnPPIX-DME+AuNPs garante-se que as AuNPs não foram expelidas da interface ar/água. Os correspondentes espectros de extinção do coloide de AuNPs e dos filmes LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs estão na Figura 36.

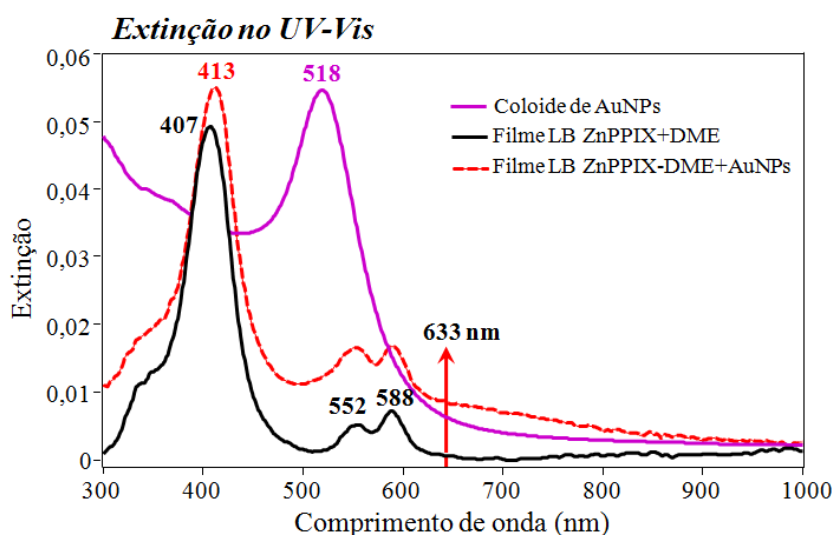


Figura 36: espectros de extinção para o coloide de AuNPs e sua respectiva extinção de *plasmon* de superfície (518 nm) e para os filmes LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs. Os espectros dos filmes LB estão plotados em escala no eixo Y e o do coloide fora de escala. A seta vermelha corresponde a excitação Raman com linha de laser em 633 nm.

A monocamada LB de ZnPPIX-DME exibe três bandas principais com máximos em 407, 552 e 588 nm, sendo a primeira referente a banda de Soret e as duas últimas à bandas Q.^{66,115} Para a monocamada LB de ZnPPIX-DME+AuNPs o espectro de extinção apresenta um pequeno deslocamento da banda de Soret para 413 nm e um ombro na região entre 600-800 nm. Zhang et al.¹²⁴ também observaram um

comportamento semelhante no espectro de extinção de uma monocamada de protoporfirina IX de zinco(II) (ZnPP) adsorvida sobre substrato de ouro. Portanto, essas mudanças apontam a coexistência de ambos os materiais no substrato, ZnPPIX-DME e AuNPs. De acordo com Zhang et al.¹³⁵ e Boeckl et al.,¹³⁶ o pequeno deslocamento da banda de Soret pode ser usado para determinar a orientação relativa das moléculas de protoporfirina entre si. O deslocamento da banda Soret para maiores comprimentos de onda (desvio para o vermelho) sugere a formação de agregação cabeça-cauda (do inglês, *head-to-tail*) (momentos de dipolo das moléculas alinhados no mesmo plano) no filme LB.

Outra possibilidade de preparação do filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs seria por imersão do substrato na suspensão coloidal de AuNPs seguida por deposição de ZnPPIX-DME em subfase de água ultrapura via técnica LB convencional. No entanto, nesse caso seria necessário recobrir o substrato, por exemplo, com um eletrólito de carga positiva uma vez que o potencial zeta das AuNPs é negativo e a carga de superfície do substrato de quartzo em água é também muito provavelmente negativa,¹³² impedindo a adsorção direta das AuNPs sobre o substrato. Portanto, como mencionado anteriormente, o processo de codeposição ocorre devido às interações entre as moléculas de ZnPPIX-DME e as AuNPs. Para demonstrar que a adsorção do coloide de AuNPs no substrato se dá preferencialmente devido a essas interações, o teste descrito abaixo e apresentado na Figura 37 foi realizado em 4 etapas subsequentes:

Etapa 1: imersão do substrato de quartzo em coloide de AuNPs por 30 minutos para verificar a adsorção (ou não) das AuNPs sobre a superfície do substrato. 30 minutos é o período (aproximadamente) que o substrato é mantido imerso na subfase durante a deposição da monocamada LB.

Etapa 2: obtenção do espectro de extinção do substrato de quartzo após 30 minutos de imersão em coloide de AuNPs (etapa 1).

Etapa 3: imersão do substrato de quartzo (etapa 2) em água ultrapura por 30 minutos para verificar a dessorção (ou não) das AuNPs sobre a superfície do substrato.

Etapa 4: obtenção do espectro de extinção do substrato de quartzo após 30 minutos de imersão em água ultrapura (etapa 3).

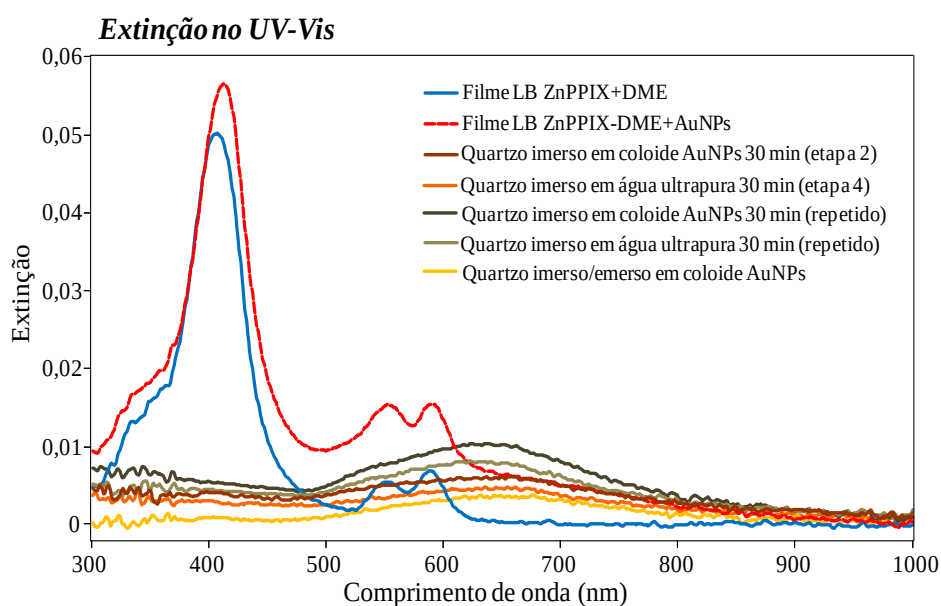


Figura 37: espectros de extinção para os filmes LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs, para o substrato de quartzo imerso em coloide de AuNPs (etapa 2: adsorção) e subsequentemente em água ultrapura (etapa 4: dessorção), para o procedimento descrito anteriormente repetido e quartzo apenas imerso e imerso em coloide de AuNPs.

A Figura 37 sugere certa adsorção das AuNPs sobre a superfície do substrato, seguida por uma parcial dessorção dessas AuNPs quando o substrato é imerso em água ultrapura. No entanto, como podemos observar, o pico máximo de extinção das AuNPs é deslocado de 518 nm (em meio aquoso) para aproximadamente 630 nm (sobre o substrato de quartzo). Esse procedimento experimental foi repetido uma vez mais a fim de verificar sua reprodutibilidade, obtendo espectros de extinção diferentes dos apresentados na Figura 37 para as etapas 2 e 4 (vide Figura 37 – quartzo imerso em

coloide AuNPs 30 min (repetido) e quartzo imerso em água ultrapura 30 min (repetido)). Um experimento semelhante ao descrito acima foi realizado, no entanto evitando deixar o substrato imerso em coloide de AuNPs por 30 minutos (apenas imersão e emersão), e obteve-se um espectro de extinção diferente do obtido anteriormente (vide Figura 37 – quartzo imerso/emerso em coloide AuNPs). O mesmo experimento também foi repetido utilizando um braço mecânico para remover o substrato de quartzo durante a deposição. A velocidade de emersão do substrato foi mantida em 1 mm/min, como usada na deposição LB. Nesse caso, praticamente nenhuma deposição do coloide de AuNPs foi observada sobre o substrato. Portanto, as AuNPs não adsorvem sobre o substrato de quartzo espontaneamente nas condições de deposição das monocamadas LB. Quando o substrato é removido (emergido) relativamente rápido da suspensão coloidal de AuNPs (por exemplo, usando as mãos), uma quantidade de coloide permanece sobre o substrato (o substrato está apenas “molhado”), formando agregados de AuNPs após a secagem, como ocorre no caso de um filme *cast*. Além disso, como não está ocorrendo uma adsorção das AuNPs no substrato e sim um efeito de “molhagem”, a cada diferente experimento de imersão/emersão do substrato em coloide de AuNPs, quantidades diferentes de coloide permanecem no substrato, gerando assim diferentes perfis espectrais.

A distribuição espacial da ZnPPIX-DME e das AuNPs na monocamada LB com resolução em escala micrométrica foi investigada via técnica de micro-Raman, combinando informação morfológica e química com um microscópio óptico acoplado a um espectrógrafo Raman. Na Figura 38a tem-se imagens ópticas e espectros de espalhamento Raman (RS) e SERS para as monocamadas LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs. Na Figura 38b tem-se os espectros RS da ZnPPIX-DME pó e de um filme LB de ZnPPIX-DME contendo 9 monocamadas e espectro SERS do filme

LB de ZnPPIX-DME+AuNPs. A estrutura molecular da ZnPPIX-DME, onde tem-se representado os carbonos meso (C_m), alfa (C_α) e beta (C_β) e indicado os grupos que a compõem, é mostrada na Figura 39. As atribuições vibracionais das principais bandas Raman dos espectros na Figura 38a estão na Tabela 5.

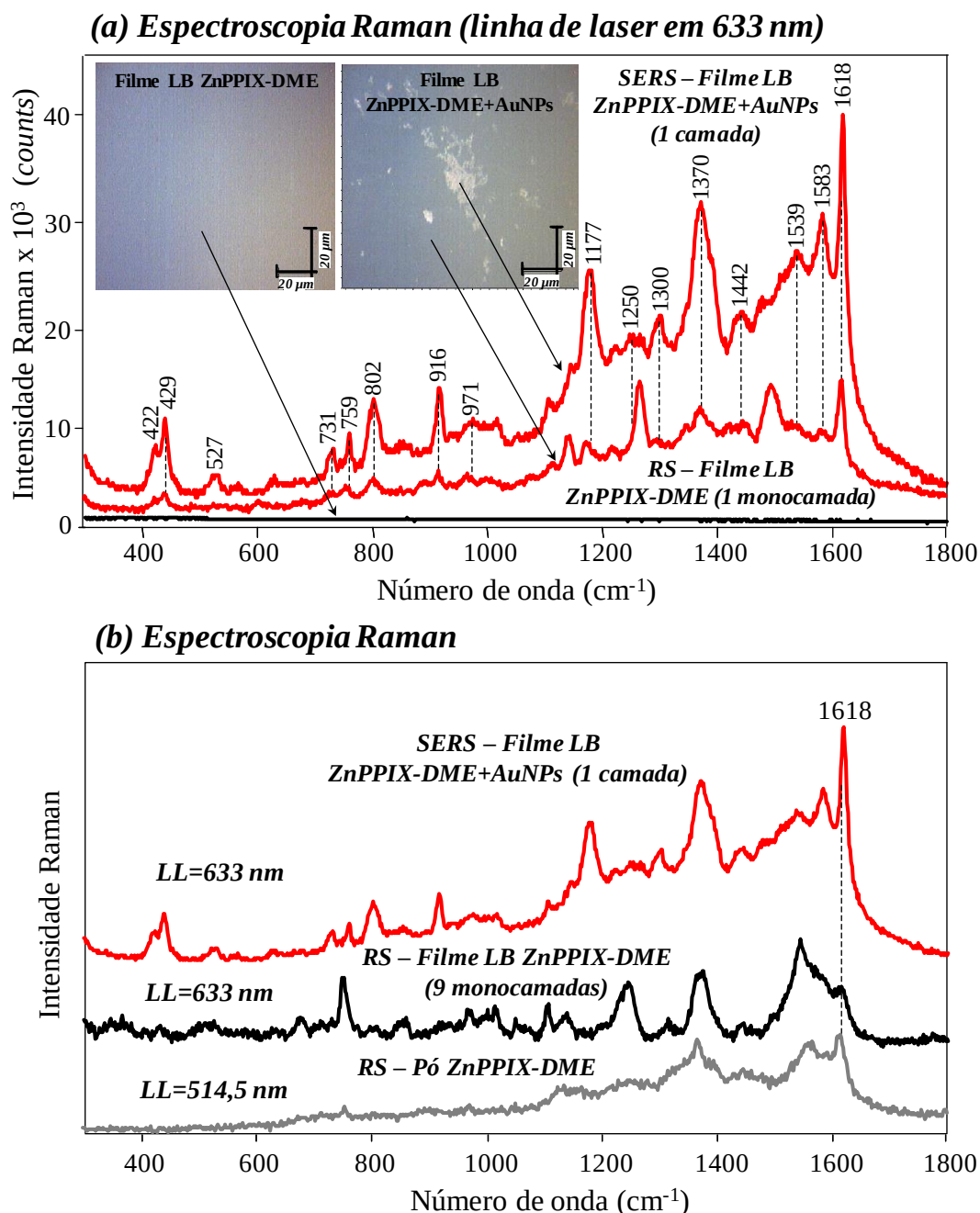


Figura 38: (a) espectros RS e SERS dos filmes LB de ZnPPIX-DME (1 monocamada) e ZnPPIX-DME+AuNPs (1 camada), respectivamente. Linha de laser em 633 nm. Os *insets* apresentam imagens ópticas de ambos os filmes LB e as flechas indicam as regiões de coleta dos espectros. (b) Espectros RS da ZnPPIX-DME pó e do filme LB (9 monocamadas) com linhas de laser em 514,5 e 633 nm, respectivamente, e espectro SERS do filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs (1 camada) com laser em 633 nm.

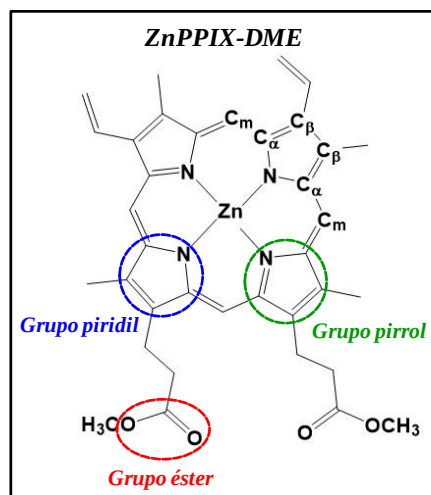


Figura 39: estrutura molecular da ZnPPIX-DME. Os carbonos meso (C_m), alfa (C_α) e beta (C_β) estão representados na molécula bem como os grupos que as compõe.

As imagens ópticas mostradas no *inset* da Figura 38a revelam a presença de agregados das AuNPs dispersas ao longo do filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs. Uma vez que as AuNPs não formam um substrato SERS homogêneo, o que é revelado pelos espectros (de 300 a 1800 cm^{-1}) registrados individualmente de vários pontos resultando em espectros SERS com intensidade absoluta variável, pode-se esperar que o máximo de intensidade SERS corresponde à regiões com maior concentração de AuNPs na superfície. É de conhecimento que o intenso campo electromagnético encontrado em agregados de nanopartículas metálicas pode levar a maiores fatores de amplificação do sinal SERS,⁴ sendo provavelmente, a razão pela qual os espectros SERS da ZnPPIX-DME são vistos com intensidades variáveis. No entanto, uma única monocamada LB, sob as mesmas condições experimentais do sinal SERS, não fornece um sinal acima do nível de ruído. Portanto, se a intensidade SERS é dividida pelo nível do ruído, um fator de amplificação de aproximadamente 10^3 é obtido. Por outro lado, usando o sinal RS de um filme LB de ZnPPIX-DME com 9 monocamadas (Figura 38b), obtemos um aproximado $EF = 4 \times 10^2$. Tal ordem de grandeza está de acordo com os EF previstos para a média dos sinais SERS considerando o mecanismo eletromagnético, onde a

amplificação é basicamente produzida pelo aumento do campo eletromagnético ao redor da superfície das nanopartículas metálicas.^{4,78}

Tabela 5: atribuições vibracionais para as bandas Raman características do pó de ZnPPIX-DME e do filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs.

ZnPPIX-DME pó (514,5 nm)	Filme LB de ZnPPIX- DME+AuNPs (633 nm)	Atribuições
-	422 e 429	Deformação fora do plano do núcleo porfirínico ¹³⁷
-	527	C–N ⁺ –CH ₃ <i>scissoring</i> ¹³⁸
-	731	Grupo N-metil-piridil <i>scissoring</i> ¹³⁸
754	759	C–H <i>wagging</i> ¹²²
-	802	Estiramento simétrico C–C ¹³⁸
-	916	Estiramento C _α –C _β do macrociclo porfirínico ¹²³
971	971	Estiramento C _α –C _β ou C _α –C _m do macrociclo porfirínico ¹²³
-	1177	Estiramento C–O ¹²²
1247	1250	Estiramento grupo éster ¹²²
-	1266	Estiramento grupo piridil ¹²³
-	1300	Grupo N-metil-piridil <i>scissoring</i> ¹²³
1365	1370	Estiramento simétrico COO ⁻ sobreposto a CH ₂ <i>scissoring</i> ^{122,124}
1443	1442	CH ₂ <i>scissoring</i> ^{122,124}
-	1494	Estiramento C _β –C _β do esqueleto porfirínico ¹²³
1552	1539	Estiramento C _β –C _β do esqueleto porfirínico ¹²³
1590	1583	Estiramento pirrol C–C ¹²²
1614	1618	Estiramento antissimétrico COO ⁻ ¹²²

Na Figura 40 tem-se uma imagem óptica de um domínio micrométrico de AuNPs na superfície do filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs e um mapeamento SERS (sobreposto a uma imagem óptica) registrado para uma área de 60 µm x 60 µm com passo de 2 µm, levando a um total de 961 espectros.

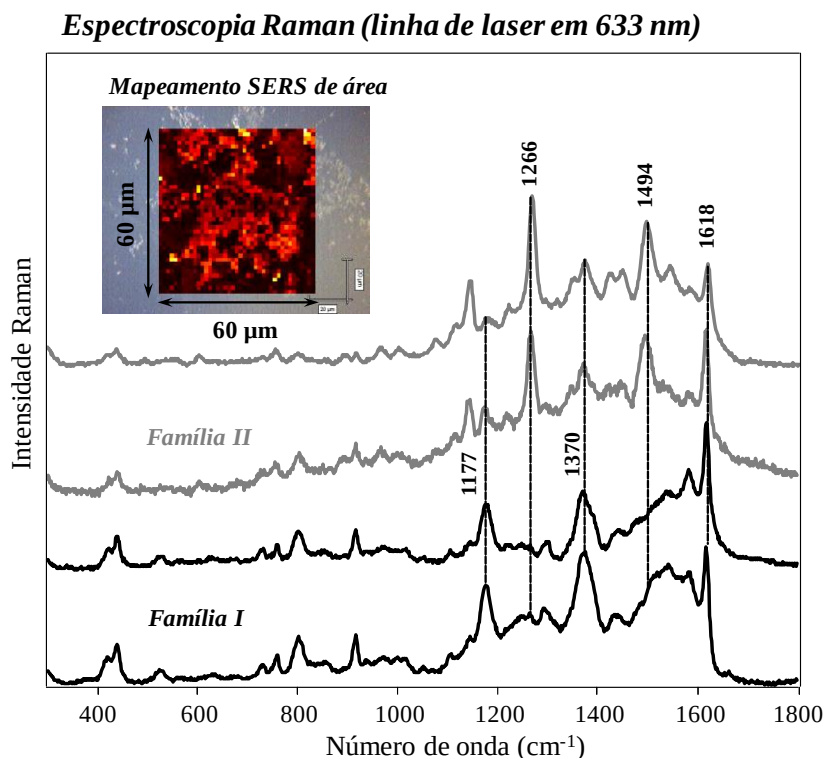


Figura 40: imagem óptica e mapeamento SERS (sobrepostos) registrados para o filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs para uma área contendo domínios de AuNPs. Um grupo de espectros SERS coletados em diferentes regiões também está apresentado.

O mapeamento de área mostrado na Figura 40 foi construído plotando a intensidade da banda em 1618 cm^{-1} , atribuída ao estiramento do grupo COO^- .¹²² Pontos mais claros no mapeamento referem-se à bandas Raman mais intensas. Pode ser observado que a intensidade das bandas variam significativamente de ponto a ponto, o que é uma consequência direta da distribuição espacial das AuNPs,⁹¹ como discutido na Figura 38a. A Figura 40 também apresenta uma coleção de espectros SERS obtidos em diferentes regiões, podendo ser identificadas duas famílias espectrais representadas pelos espectros nas cores cinza e preto. Tais espectros correspondem a bandas Raman com números de onda semelhantes. No entanto, pequenas diferenças em termos de intensidade relativa são observadas de uma família para outra.

As três principais bandas de maiores amplificações apresentadas no espectro SERS da família I são encontradas em 1177 , 1370 e 1618 cm^{-1} , e atribuídas a

estiramento C–O,¹²² estiramento simétrico COO⁻^{122,124} e estiramento antissimétrico COO⁻,¹²² respectivamente. O mesmo efeito de amplificação é observado na família II para as bandas em 1266, 1494 and 1618 cm⁻¹, atribuídas a estiramento do grupo piridil,¹²³ estiramento C_β–C_β do esqueleto porfirínico¹²³ e estiramento antissimétrico COO⁻,¹²² respectivamente. No caso da família I esses modos vibracionais pertencem às porções ésteres, enquanto para a família II são referentes às porções ésteres mais o esqueleto porfirínico. Uma vez que a amplificação do sinal depende altamente da orientação molecular e da distância entre os grupos moleculares e as nanopartículas,^{3,4} pode-se assumir que as moléculas de ZnPPIX-DME estão adsorvidas fisicamente sobre a superfície dos agregados de AuNPs levando a duas predominantes orientações molécula-superfície.

As regras de seleção de superfície para o efeito SERS baseiam-se no fato de a superfície metálica ser polarizada fortemente pela luz incidente. Dessa forma, o campo eletromagnético local ($\vec{E}_{\text{local}}$) pode ser visto como a soma de uma componente perpendicular à superfície ou alinhada à normal ($\vec{E}_n$) e uma componente paralela ou tangente à superfície ($\vec{E}_t$),^{3,4} sendo maior a contribuição da componente alinhada à normal ($\vec{E}_n$). Considerando que no efeito SERS o dipolo induzido na superfície metálica (P_{SERS}) é dado pelo produto escalar da polarizabilidade da molécula ($\vec{\alpha}$) e do campo eletromagnético local ($\vec{E}_{\text{local}}$): $P_{\text{SERS}} = \vec{\alpha} \cdot \vec{E}_{\text{local}}$, modos vibracionais com dipolos paralelos ao $\vec{E}_{\text{local}}$ resultarão em máximas amplificações e modos vibracionais com dipolos perpendiculares ao $\vec{E}_{\text{local}}$ resultarão em amplificações de menores intensidades. Dessa forma, as bandas de maiores amplificações serão aquelas referentes a modos vibracionais cujos dipolos estão paralelos ao $\vec{E}_{\text{local}}$ (perpendiculares à superfície da nanopartícula). Portanto, considerando as regras de seleção de superfície e as bandas amplificadas nas famílias I e II, os espectros da família I sugerem que as moléculas

estão orientadas verticalmente e adsorvidas sobre as AuNPs através dos grupos ésteres, como sugerido no *inset* da Figura 41. Esse último não está apenas de acordo com o modelo de interações proposto pelas propriedades do filme de Langmuir (*inset* Figura 34a), mas também sugere que essas interações são mantidas na fabricação do filme LB. Enquanto que os espectros da família II sugerem que as moléculas também estão verticalmente orientadas e adsorvidas sobre as AuNPs via grupos ésteres e esqueleto porfirínico, como sugerido no *cartoon* da Figura 41.

Orientação molecular (ZnPPIX-DME)

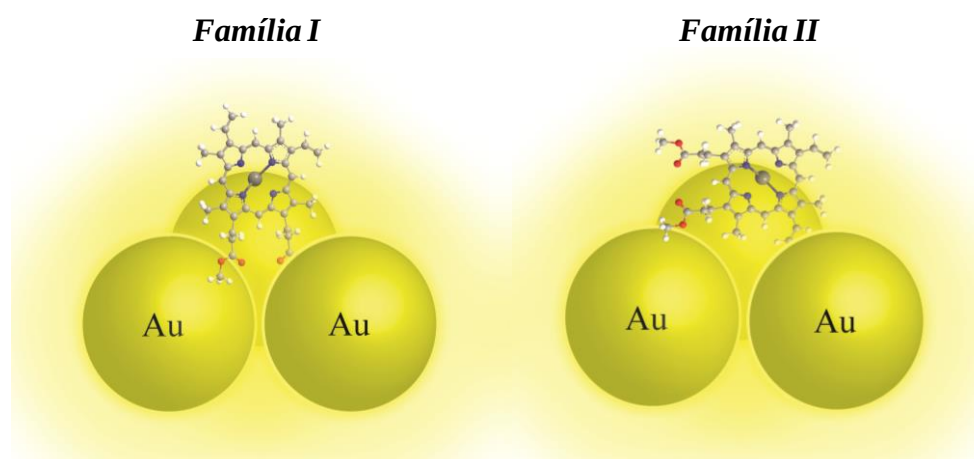
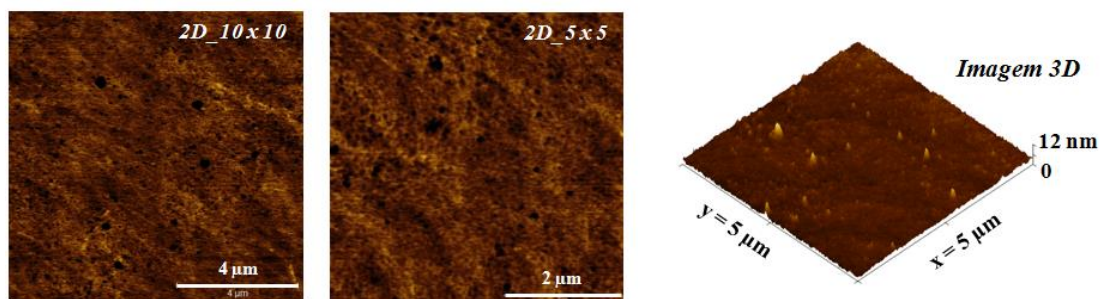


Figura 41: orientação proposta para as moléculas de ZnPPIX-DME adsorvidas sobre as AuNPs considerando as regras de seleção de superfície e as bandas amplificadas nos espectros SERS das famílias I e II (Figura 33). O esquema está representado fora de escala quando comparada as dimensões da AuNP (diâmetro: 16 nm) e da ZnPPIX-DME (altura: 1,5 nm e base: 1,2 nm).

Em termos de morfologia em escala nanométrica, as Figuras 42a e 42b apresentam imagens AFM (2 e 3 dimensões) para os filmes LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs, respectivamente. Complementarmente, as imagens de AFM foram caracterizadas via rugosidade (RMS) e altura média (diferença de altura entre picos e vales). Os valores de rugosidade e altura média foram obtidos para áreas de 30 μm x 30 μm , 20 μm x 20 μm , 10 μm x 10 μm e 5 μm x 5 μm e estão apresentados na Tabela 6. Os baixos valores em termos de rugosidade e altura média apresentada pelo

substrato de quartzo asseguram a não interferência do substrato na morfologia dos filmes.

(a) Filme LB de ZnPPIX-DME



(b) Filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs

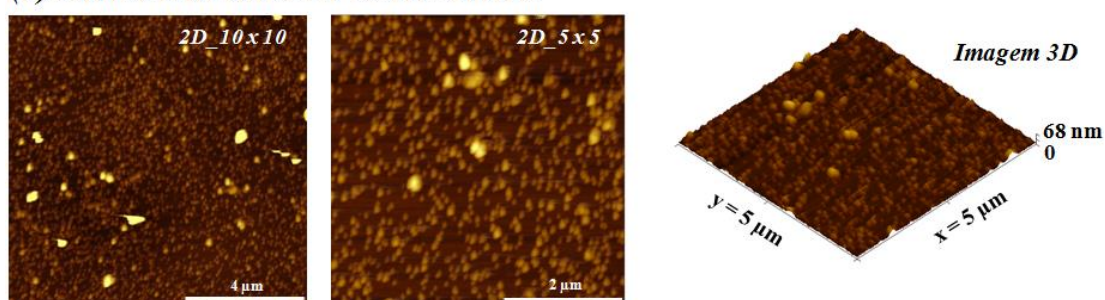


Figura 42: imagens topográficas de AFM em 2 e 3 dimensões para os filmes LB de (a) ZnPPIX-DME e (b) ZnPPIX-DME+AuNPs. Para ambos os filmes apenas uma camada LB foi depositada.

Tabela 6: rugosidade (RMS) e altura média para os filmes LB de ZnPPIX-DME e ZnPPIX-DME+AuNPs.

Amostra (Filme LB)	Área (μm^2)	Rugosidade (nm)	Altura média (nm)
ZnPPIX-DME	30 x 30	1,0	6,4
	20 x 20	1,0	5,9
	10 x 10	1,0	4,2
	5 x 5	0,7	3,5
ZnPPIX-DME+AuNPs	30 x 30	11,1	24,4
	20 x 20	11,2	22,9
	10 x 10	10,0	30,8
	5 x 5	6,5	19,0
Substrato de quartzo	30 x 30	0,8	1,0
	20 x 20	0,4	0,8
	10 x 10	0,3	0,7
	5 x 5	0,2	0,9

Uma análise visual das imagens de AFM (Figura 42), obtidas para áreas de 10 μm x 10 μm e 5 μm x 5 μm , confirma a presença das AuNPs em escala nanométrica no filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs. Ainda com relação às imagens de AFM (Figura 42b), nota-se pequenos agregados de AuNPs (entre 27 e 35 nm) distribuídos ao longo de todo o filme e uma menor quantidade de domínios contendo agregados maiores. Provavelmente, esses domínios de maior agregação tratam-se dos domínios também encontrados em escala micrométrica via imagem óptica de micro-Raman, onde maiores fatores de amplificação SERS são obtidos. Hajduková et al.,¹³⁹ e Muthukumar et al.,¹⁴⁰ trabalhando com substratos SERS-ativos, também observaram a presença de pequenos agregados de AuNPs. No primeiro caso, o substrato de AuNPs foi preparado por silanização e adição em suspensão coloidal, onde verificou-se a presença de pequenos agregados de centenas de nanômetros (cerca de 30-100 nm) na superfície do substrato. Já no segundo caso, as AuNPs foram imobilizadas sobre a superfície de uma monocamada automontada de meso-tetra(*para*-aminophenyl)porphyrinatocobalt(II) (Co(II)MTpAP) e agregados com tamanhos de ~ 40 nm foram encontrados sobre a superfície da monocamada. Quando comparado esse valor ao diâmetro das AuNPs sintetizadas (~ 13 nm), nota-se um aumento no tamanho das AuNPs, o qual atribui-se a agregação das AuNPs sobre a superfície do substrato.^{140,141}

A presença de agregados de AuNPs no filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs resultam em altos valores relativos de rugosidade (RMS) e altura média quando comparado ao filme LB de ZnPPIX-DME, como pode ser verificado na Tabela 6. Tais agregados geram um filme com valores de rugosidade cerca de 90,5% maiores que do filme LB de ZnPPIX-DME. Correlacionando os nossos dados com os da literatura, Seitz et al.¹⁴² também observaram aumentos significativos nos valores de rugosidade para AuNPs imobilizadas em substratos silanizados. Nesse caso, um aumento de até

aproximadamente 86% foi verificado com relação à rugosidade do substrato + grupos silanos. Além disso, os autores também afirmaram que o grau de rugosidade encontrado nos substratos está diretamente relacionado com o efeito SERS. Portanto, uma vez que a presença de agregados de AuNPs no filme LB de ZnPPIX-DME+AuNPs resultam em altos valores relativos de RMS, podemos afirmar que tais valores estão diretamente relacionados com as regiões de “*hot spots*” e por sua vez com maiores amplificações do efeito SERS, corroborando com os resultados da Figura 38a e com a literatura.¹⁴²

Capítulo 6

6. Fluorescência amplificada em superfície por nanopartículas recobertas com sílica

Esse capítulo apresenta a utilização de nanopartículas de ouro recobertas com sílica (Au-SHINs) demonstrando três variáveis experimentais que podem ser facilmente implementadas para aumentar os fatores de amplificação (EF) em aplicações de SEF: ajuste do tamanho da nanopartícula, seguido de agregação, e diminuição da temperatura da amostra. Nesse sentido, medidas de SEF foram realizadas em três sistemas diferentes: i) solução aquosa de cristal violeta (CV) contendo Au-SHINs, com adição de diferentes volumes de solução de NaCl para agregação das SHINs; ii) monocamada LB mista de bis(pentadecilimido) perileno e ácido esteárico (15CPTCD/EA 1:1000); e iii) SEF dependente da temperatura para monocamada LB pura de eosina decil éster (EOSDEC). As moléculas utilizadas nesse estudo foram escolhidas de acordo com os critérios listados a seguir. i) CV ($\Phi_f = 5 \times 10^{-5}$): trata-se de uma boa referência de comparação dos fatores de amplificação; ii) 15CPTCD ($\Phi_f = 0,94$): apresenta espectros de emissão de fluorescência com diferentes comprimentos de onda de excitação (514,5 nm e 633 nm), podendo estar ou não em ressonância com o *plasmon* de extinção das Au-SHINs e iii) EOSDEC ($\Phi_f = 0,2$): possui espectro de emissão de fluorescência em total ressonância com o *plasmon* de extinção das Au-SHINs maiores (100 nm).

6.1. Medidas de SEF em solução aquosa de CV

As medidas de SEF em solução aquosa de CV foram realizadas com Au-SHINs de 40 e 100 nm recobertas com sílica por 3 e 6 horas, respectivamente. As imagens de MET bem como os diâmetros e espessuras da camada de sílica das Au-SHINs 40 nm com 3 horas de recobrimento e Au-SHINs 100 nm com 6 horas de recobrimento, estão mostradas na Figura 43.

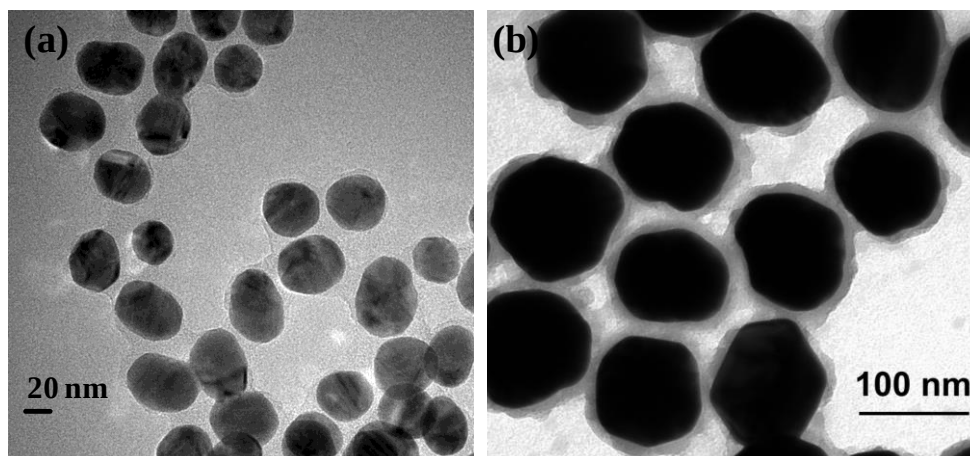


Figura 43: imagens de MET das (a) Au-SHINs 40 nm com 3 horas de recobrimento (extinção de *plasmon* com máximo em 530 nm) e (b) Au-SHINs 100 nm com 6 horas de recobrimento (extinção de *plasmon* com máximo em 570 nm).

As Au-SHINs mostradas na Figura 43a têm diâmetro médio de $38,0 \pm 1,6$ nm e recobrimento de sílica com espessura de $7,8 \pm 0,4$ nm, enquanto as Au-SHINs mostradas na Figura 43b têm diâmetro médio de $98,0 \pm 7,0$ nm e recobrimento de sílica com espessura de $9,7 \pm 0,7$ nm.

Os experimentos de SEF em solução aquosa foram realizados com o cristal violeta por tratar-se de uma molécula cujo rendimento quântico (ϕ) é baixa; $\phi=5 \times 10^{-5}$ em água, e por ser uma boa referência de comparação dos fatores de amplificação.¹² Os correspondentes espectros de extinção e fluorescência da solução de CV (6×10^{-6} mol/L) são mostrados na Figura 44, bem como os espectros de extinção das Au-SHINs 40 nm recobertas com sílica por 3 horas (máximo em 530 nm) e Au-SHINs 100 nm recobertas com sílica por 6 horas (máximo em 570 nm).

Os resultados de SEF para as Au-SHINs de 40 nm e 100 nm em solução de CV estão apresentados nas Figuras 45 e 46, respectivamente. Em ambos os casos o espectro de fluorescência da solução de CV é dado como referência para os cálculos de fatores de amplificação (EF). Os espectros SEF são das soluções de CV + Au-SHINs e CV +

Au-SHINs + NaCl (200, 500 e 800 μL), sendo que tanto no espectro de fluorescência quanto nos espectros SEF a concentração final do CV é 6×10^{-6} mol/L.

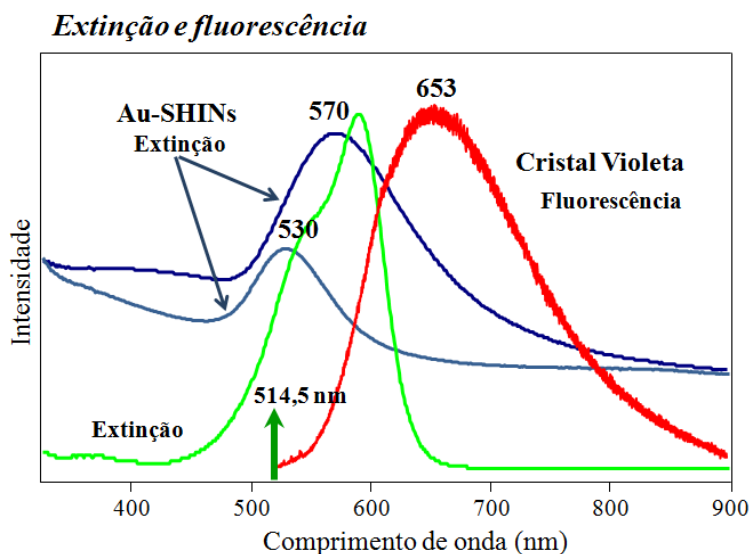


Figura 44: espectros de extinção das Au-SHINs 40 e 100 nm, com picos máximos de extinção de *plasmon* em 530 e 570 nm, respectivamente, e espectros de extinção e emissão da solução de CV (6×10^{-6} mol/L). A seta verde corresponde a linha de laser de excitação em 514,5 nm.

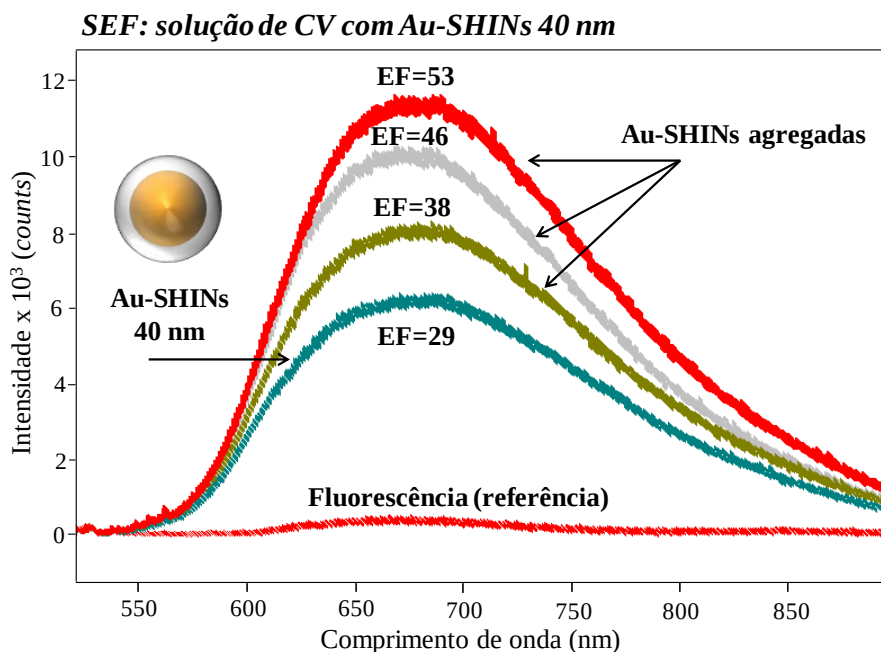


Figura 45: espectros de fluorescência e SEF para a solução de CV. O espectro referência é a emissão da solução de CV (6×10^{-6} mol/L) e os espectros SEF são das soluções de CV contendo Au-SHINs 40 nm (EF=29) e Au-SHINs 40 nm agregadas com adição de diferentes volumes de NaCl (0,1 mol/L): 200 μL (EF=38), 500 μL (EF=46) e 800 μL (EF=53). A concentração da CV em Au-SHINs é a mesma que em água ultrapura e a linha de laser de excitação em 514,5 nm.

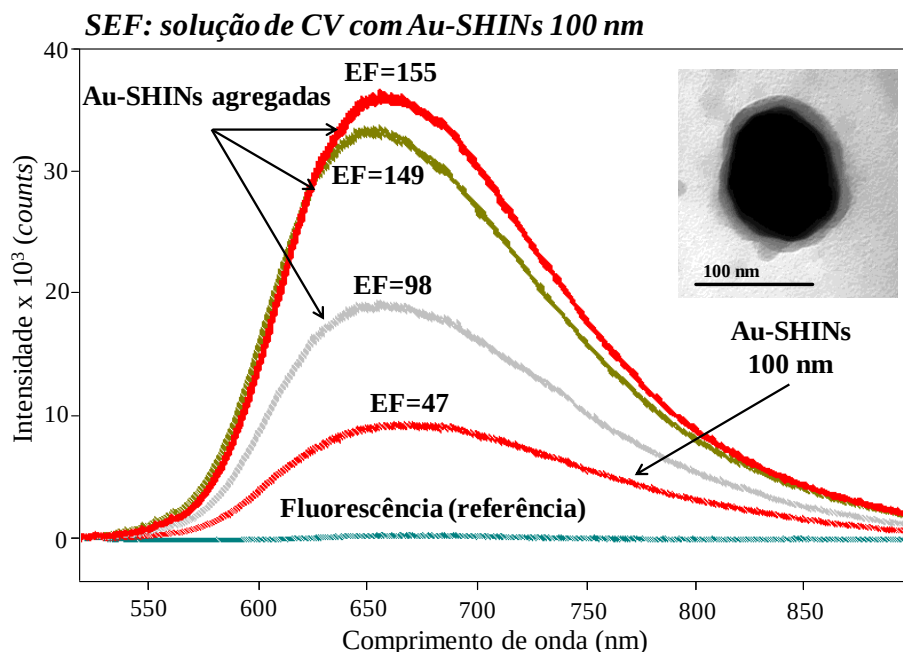


Figura 46: espectros de fluorescência e SEF para a solução de CV. O espectro referência é a emissão da solução de CV (6×10^{-6} mol/L) e os espectros SEF são das soluções de CV contendo Au-SHINs 100 nm (EF=47) e Au-SHINs 100 nm agregadas com adição de diferentes volumes de NaCl (0,1 mol/L): 200 μ L (EF=38), 500 μ L (EF=46) e 800 μ L (EF=155). A concentração da CV em Au-SHINs é a mesma que em água ultrapura e a linha de laser de excitação em 514,5 nm. O *inset* apresenta uma imagem de MET de uma Au-SHIN 100 nm.

Os resultados de SEF para as soluções de CV contendo Au-SHINs 40 nm, Figura 45, apresentam um fator de amplificação de 29 vezes (EF = 29) obtido para o sistema contendo apenas Au-SHINs. Com a adição de 800 μ L de NaCl (0,1 mol/L) o efeito da agregação das Au-SHINs leva a um aumento na média dos fatores de amplificação de EF = 29 para EF = 53. Os resultados de SEF para as soluções de CV contendo Au-SHINs 100 nm, Figura 46, foram registrados sobre as mesmas condições dos resultados mostrados na Figura 45. No caso da solução de CV contendo Au-SHINs 100 nm não agregadas um EF = 47 foi obtido, enquanto para as Au-SHINs 100 nm agregadas (adição de 800 μ L de NaCl 0,1 mol/L) foi alcançado um impressionante máximo EF = 155, o maior valor de EF observado para os nossos resultados de SEF em solução de CV.

Comparando os EF obtidos para as soluções de CV contendo Au-SHINs de 40 e 100 nm agregadas, um aumento do E_{local} de 1,7 vezes maior é observado para as Au-SHINs de 100 nm agregadas. O modelo mais simples para os agregados, que é de um dímero, e os cálculos teóricos comparativos (realizados com o *software* de diferenças finitas no domínio do tempo, FDTD) foram feitos considerando Au-SHINs de 40 e 100 nm, recobertas com uma espessura de sílica fixa em 10 nm, espessura essa próxima aos valores encontrados para o recobrimento das Au-SHINs 40 e 100 nm por 3 e 6 horas, respectivamente. Os resultados de campo próximo e secção transversal de espalhamento estão apresentados nas Figuras 47, 48 e 49.

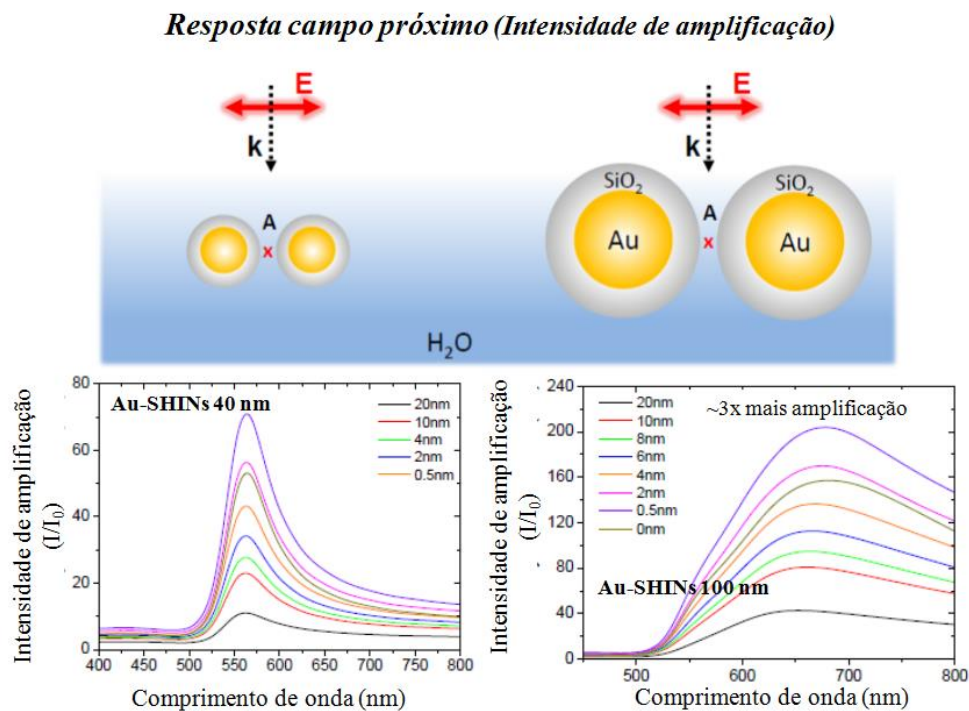


Figura 47: resposta do campo próximo e intensidade de amplificação para as Au-SHINs de 40 nm e 100 nm, recobertas com uma espessura de sílica fixa em 10 nm. O gap entre as duas Au-SHINs (representado por x) varia de 0 a 20 nm.

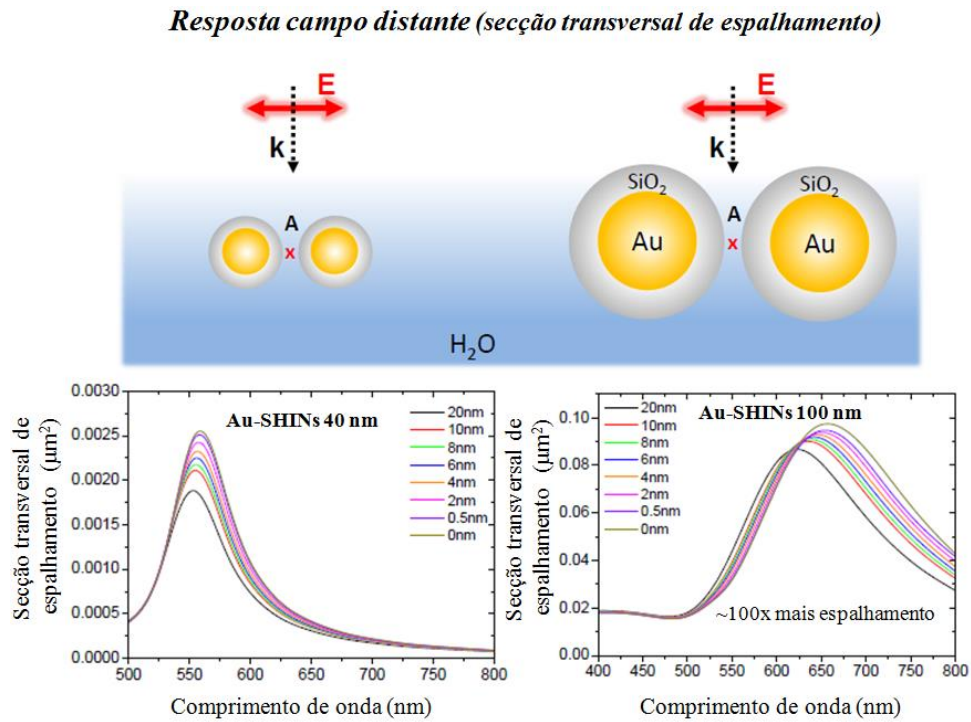


Figura 48: secções transversais de espalhamento calculadas para os dímeros das Au-SHINs de 40 nm e 100 nm. O *gap* entre as duas Au-SHINs (representado por x) varia de 0 a 20 nm.

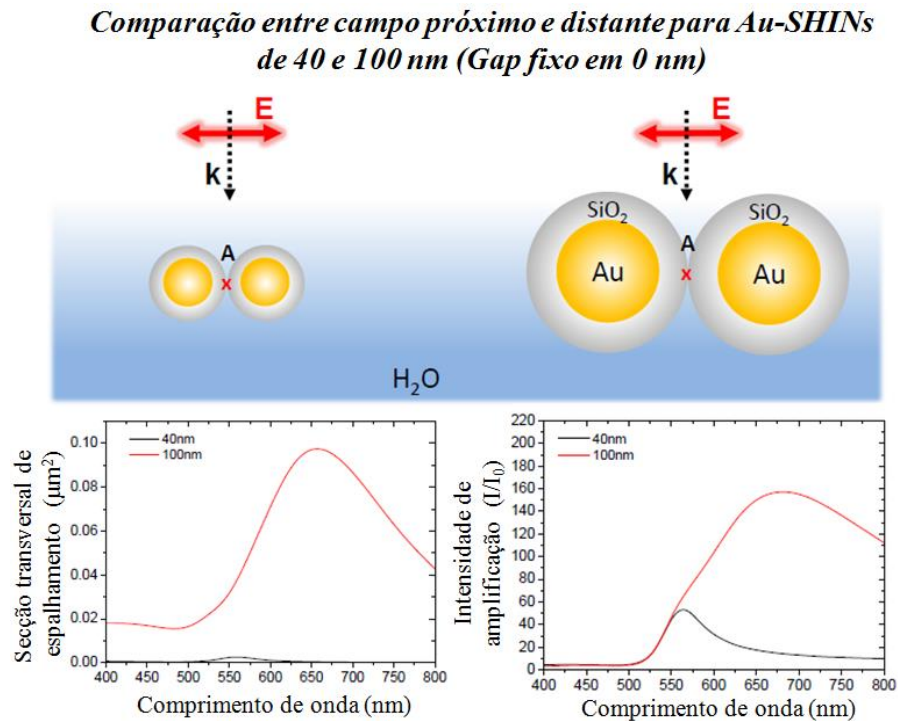


Figura 49: comparação entre campo próximo e distante para Au-SHINs de 40 nm e 100 nm, recobertas com uma espessura de sílica fixa em 10 nm.

A amplificação do campo próximo para as Au-SHINs 100 nm é cerca de 3 vezes maior que para as Au-SHINs 40 nm. Além disso, o espalhamento do campo distante para as Au-SHINs 100 nm é aproximadamente 2 ordens de grandeza maior, levando a um efeito de melhora do EF devido ao maior acoplamento da emissão do CV (fluorescência) com o espalhamento das Au-SHINs 100 nm (campo distante). O espalhamento calculado para as Au-SHINs 100 nm, Figura 48, sobrepõe-se com a emissão do CV mostrada na Figura 44. Esse resultado é analisado por equações de Maxwell resolvidas numericamente considerando uma onda plana incidente com a geometria exata de dímeros de nanopartículas no formato caroco-casca (do inglês, *core-shell*. Referindo-se caroco às nanopartículas de ouro e casca ao recobrimento com sílica) imersos em água. As simulações foram realizadas pelo Dr. Pablo Albella (Department of Physics, Imperial College London, Reino Unido) com o *software* de diferenças finitas no domínio do tempo (FDTD, *finite-difference time-domain*) (Lumerical)[®], utilizando dados ópticos do livro de referência de Palik.¹⁴³ Esse método numérico é bem estabelecido em eletromagnetismo computacional para calcular a resposta óptica de nanoestruturas diferentes.¹⁴⁴

6.2. Medidas de SEF em monocamada LB mista de 15CPTCD/EA

Os resultados de SEF para a monocamada LB mista de 15CPTCD/AE contendo Au-SHINs de 40 e 100 nm recobertas com sílica por 3 e 6 horas, respectivamente, estão ilustrados na Figura 50. As propriedades de monocamadas de Langmuir e LB de derivados perilenos (PTCD) têm sido relatadas na literatura.¹⁰⁵ Os resultados de SEF para a monocamada LB de 15CPTCD/AE, mostrados na Figura 50, apresentam a emissão do monômero em aproximadamente 557 nm excitado com linha de laser em 514,5 nm, e a emissão do excímero em cerca de 679 nm, observado com linha de laser de excitação em 633 nm. Deve ser destacado que a linha de laser em 514,5 nm propicia

uma dupla ressonância; com a extinção do fluoróforo e com a extinção de *plasmon* das Au-SHINs. No entanto, a linha de laser em 633 nm está em ressonância apenas com a extinção de *plasmon* das Au-SHINs. Nesse segundo caso, o EF para a emissão do excímero em aproximadamente 679 nm é apenas 7, sendo necessário um ajuste mais adequado da extinção de *plasmon*, por exemplo com nanobastões,¹⁰ para alcançar valores de EFs mais altos. Mesmo assim, essa fraca emissão do excímero observada em 679 nm para a monocamada LB mista de 15CPTCD/AE é vista graças à ampla natureza do *plasmon* das Au-SHINs 100 nm, permitindo o acoplamento entre a emissão do fluoróforo e a extinção do *plasmon*. As Au-SHINs 100 nm fornecem um maior fator de amplificação (EF ~ 60) no espectro SEF referente a emissão do monômero (~ 557 nm) quando comparada as Au-SHINs 40 nm (EF ~ 25). Muito provavelmente devido ao maior acoplamento da extinção de *plasmon* e da emissão de fluorescência, bem como uma melhor eficiência do campo distante através do espalhamento das nanopartículas.

SEF: monocamada LB 15CPTCD/AE

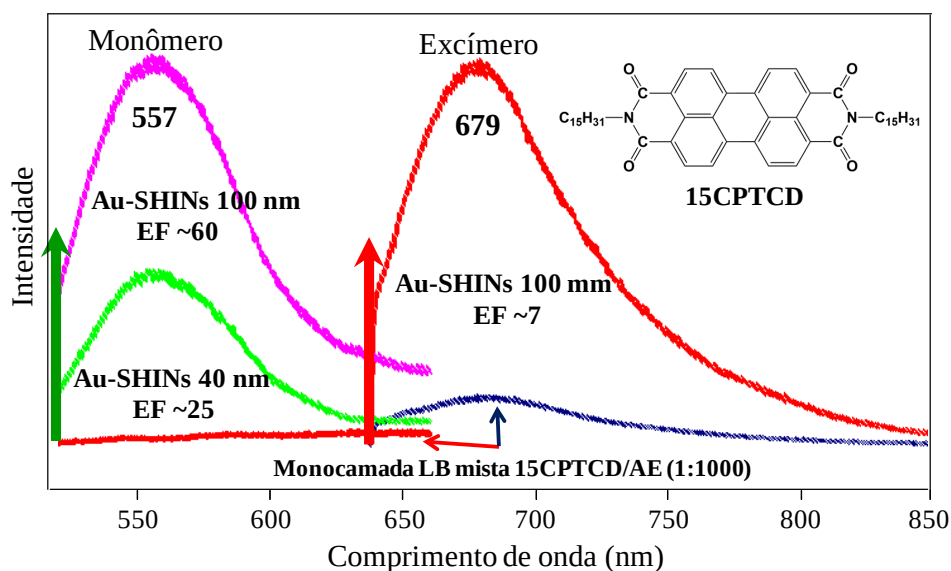


Figura 50: espectros SEF da monocamada LB mista de 15CPTCD/AE mostrando a emissão do monômero, excitado com linha de laser em 514,5 nm e com máximo em aproximadamente 557 nm, e a emissão do excímero em 679 nm observada com linha de laser de excitação em 633 nm. As flechas verde e vermelha representam as linhas de laser em 514,5 nm e 633 nm, respectivamente.

6.3. Medidas de SEF em monocamada LB de EOSDEC

A luminescência de filmes LB mistos de EOSDEC e ácido palmítico (PA) em substratos sólidos foi verificada principalmente em monômeros moleculares, ao passo que os dímeros não exibiram uma fluorescência considerável.¹⁴⁵ Nesse caso, a fluorescência mais intensa do monômero foi observada para um filme LB de EOSDEC:PA na proporção 1:100 e notou-se que um aumento na concentração do corante resultava na supressão da fluorescência do filme LB. Nos resultados de-SEF a seguir, uma monocamada LB de EOSDEC pura (isoterma π -A, pressão de superfície vs área molecular média, dada na Figura 51) foi fabricada, apresentando um espectro de fluorescência do monômero centrado em 557 nm e uma banda larga de fosforescência entre 680-700 nm, como verificado na Figura 52.

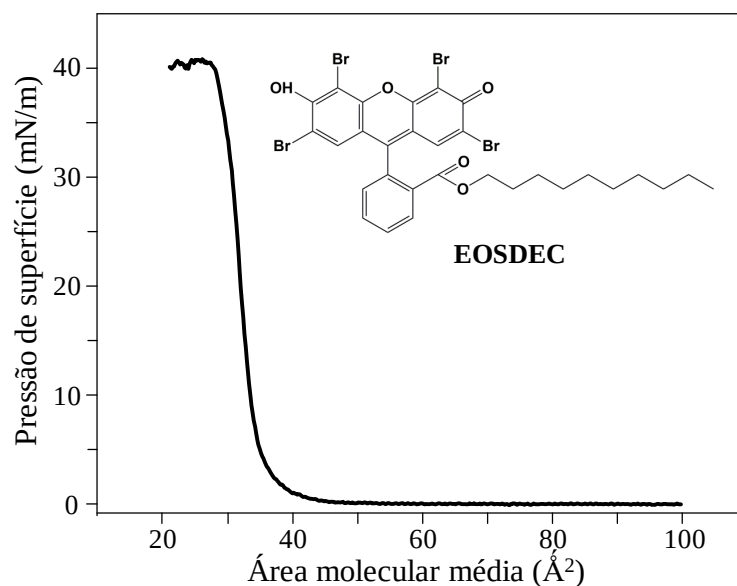


Figura 51: isoterma π -A (pressão de superfície vs área molecular média) da monocamada de Langmuir de EOSDEC com velocidade de compressão das barreiras de 10 mm/min.

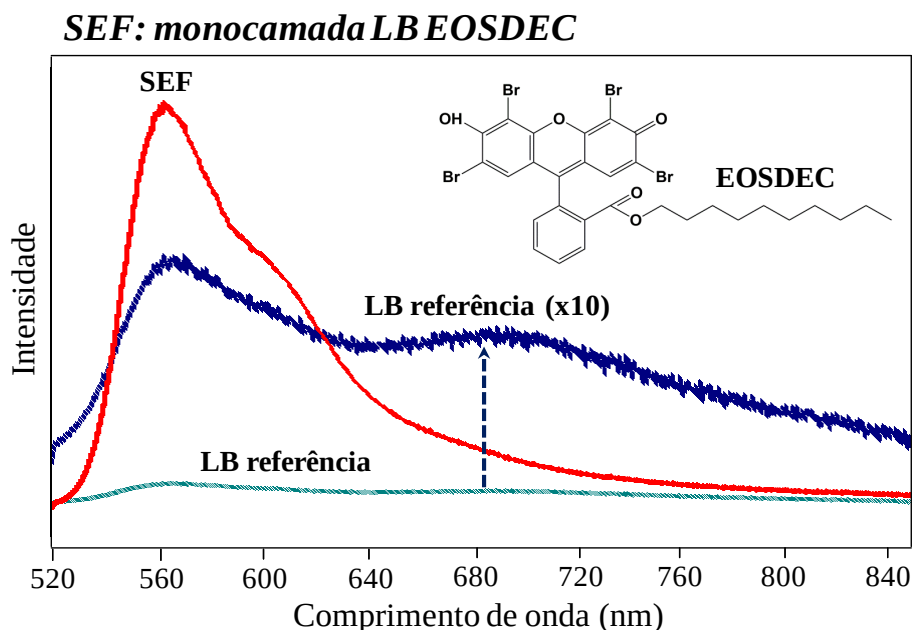


Figura 52: espectro de emissão da monocamada LB de EOSDEC dado como referência e espectro SEF obtido com Au-SHINs 100 nm a 23 °C e linha de laser em 514,5 nm.

A emissão do monômero está completamente de acordo com a emissão dos filmes LB de EOSDEC:PA,¹⁴⁵ e com o espectro de emissão das moléculas de eosina,¹⁴⁶ incluindo filmes LbL de eosina.¹² Mishra et al.¹⁴⁶ relataram o espectro de luminescência da eosina em glicerol com um máximo em 550 nm observado para a fluorescência e em 690 nm para a fosforescência. O fluoróforo eosina tem um rendimento quântico (ϕ) relativamente alta; $\phi=0,2$ em água e $\phi=0,69$ em etanol.¹⁴⁷ Ao espalharmos as Au-SHINs 100 nm sobre a monocamada LB de EOSDEC, uma distribuição randômica de SHINs sobre a superfície do filme LB é produzida, e, correspondentemente, vários fatores de amplificação podem ser estimados, como observado na Figura 53.

Um fator de amplificação de 110 vezes ($EF = 110$) foi detectado para a fluorescência do monômero. Esse EF relativamente alto é devido à proximidade da extinção de *plasmon* das Au-SHINs 100 nm e da emissão de fluorescência da EOSDEC, além da eficiência do campo distante através do espalhamento das Au-SHINs. O pico máximo de extinção de *plasmon* das Au-SHINs 100 nm (Figura 44) está em perfeita

ressonância com a emissão de fluorescência do monômero, mas está distante da fosforescência da EOSDEC (Figura 52) para produzir uma amplificação da fosforescência. No entanto, amplificações da fosforescência poderiam ser obtidas com SHINs no formato de nanobastões, cuja extinção de *plasmon* está na região de 680 – 700 nm.

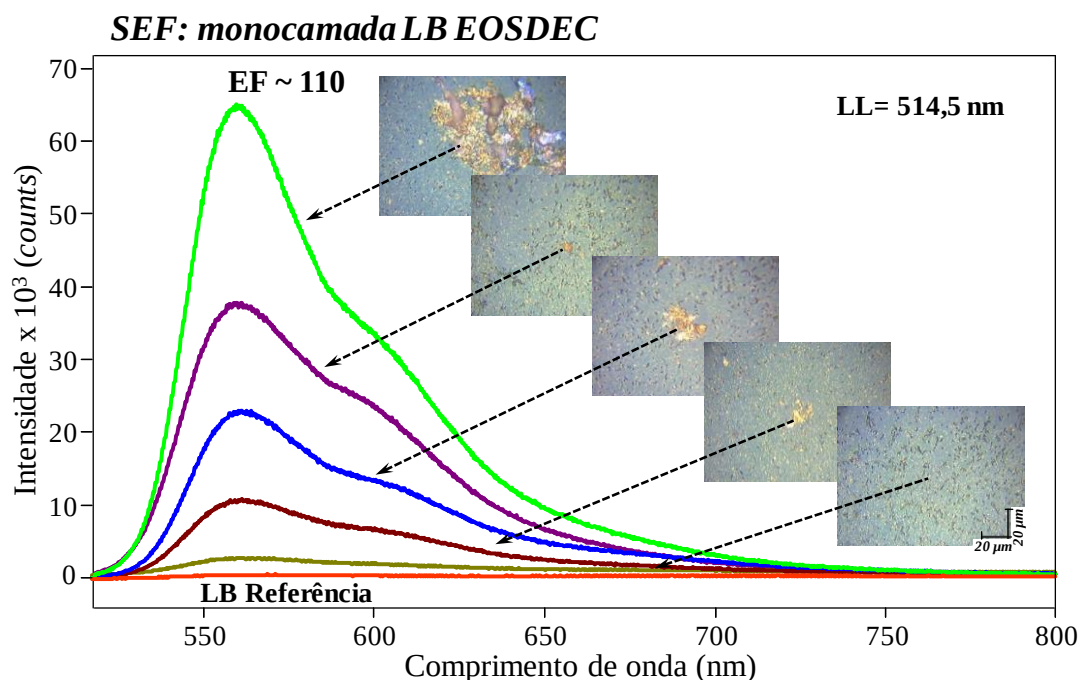


Figura 53: medidas de SEF (23 °C) para Au-SHINs de 100 nm espalhadas sobre a monocamada LB de EOSDEC. A excitação foi realizada com linha de laser em 514,5 nm. Os *insets* correspondem as imagens ópticas das regiões onde foram coletados os espectros SEF.

As propriedades de amplificação de *plasmons* foram ainda mais exploradas a partir de medidas de SEF à baixa temperatura, realizadas para a monocamada LB de EOSDEC contendo Au-SHINs 100 nm espalhadas sobre a superfície do filme. Um conjunto representativo de espectros SEF obtidos na faixa de temperatura de +23 °C a -130 °C está mostrado na Figura 54.

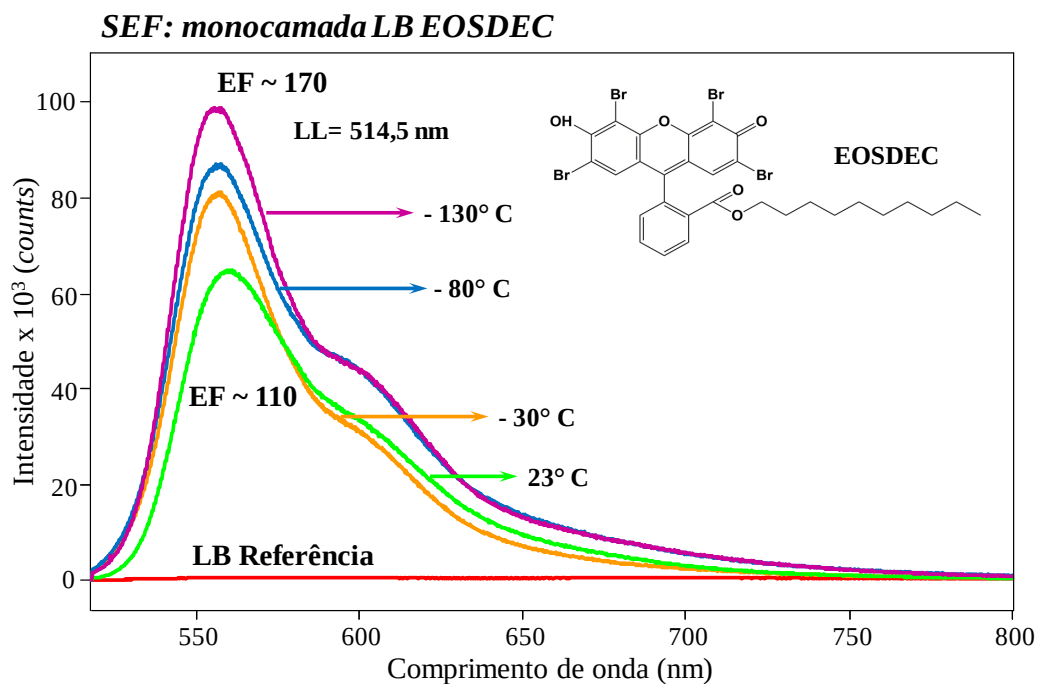


Figura 54: medidas de SEF dependente da temperatura para Au-SHINs 100 nm espalhadas sobre a monocamada LB de EOSDEC. Linha de laser em 514,5 nm. No inset tem-se representada a estrutura molecular da EOSDEC.

Nota-se, no conjunto de espectros SEF dado na Figura 54, que com a diminuição da temperatura, de +23 °C para -130 °C, tem-se um aumento da amplificação da emissão, alcançando um valor estimado de $EF = 170$. As características do espectro SEF à temperatura ambiente são mantidas em toda a faixa de temperatura, de +23 °C a -130 °C; a fluorescência do monômero domina o espectro excitado com a linha de laser em 514,5 nm, e a fosforescência é imperceptivelmente amplificada pelas Au-SHINs com extinção de *plasmon* em 570 nm. Por sua vez, o principal componente do espectro SEF, com um pico máximo em 556 nm, mantém-se inalterado, com a mesma largura total a meia altura (FWHM, *full width at half maximum*) ao longo de todo o intervalo de temperatura, como pode ser visto na Figura 54. Ibraev e Zhunusbekov¹⁴⁵ detectaram um deslocamento termocrômico na luminescência da eosina em monocamadas LB mistas de EOSDEC/PA na faixa de temperatura entre +20 °C a -183 °C, além de um alargamento não homogêneo na banda de fluorescência. A deconvolução das bandas de

fluorescência, mostradas na Figura 54, para a monocamada LB pura de EOSDEC não apresenta um deslocamento ou alargamento significativo para qualquer um dos dois componentes. No entanto, certos arranjos moleculares especiais em filmes ultrafinos podem proporcionar efeitos termocrômicos que podem ser destinados a aplicações em sensores luminescentes ou termômetros moleculares.¹⁴⁸

Todos os espectros SEF, dependentes da temperatura, foram registrados com uma potência de laser constante e muito baixa (microwatts). Durante a excitação do *plasmon* a temperatura local é aumentada, a absorção nas nanoantenas produz um aumento da temperatura do entorno que é detectada pelas moléculas no local.¹⁴⁹ No decorrer das medidas, toda a estrutura molecular termaliza e uma redução na emissão da fluorescência das moléculas ao redor das “nanoantenas” ocorre. Essa redução na fluorescência das moléculas é devido a ativação térmica dos canais não-radiativos (transferência intramolecular, relaxão vibracional (perda de energia por colisões), conversão interna (quando dois níveis eletrônicos se sobrepõem), conversão externa (quando o elétron passa de um nível mais excitado para um nível menos excitado sobreposto ao primeiro) ou cruzamento intersistema (quando ocorre uma transição de spin).^{150–152} Esse efeito da temperatura local é cancelado e revertido resfriando a amostra, como demonstrado nos resultados da Figura 54. O resfriamento da amostra diminui os canais não-radiativos levando a maiores fatores de amplificação.

Capítulo 7

7. Aplicação ambiental: detecção de ametrina via espalhamento Raman amplificado em superfície

Esse capítulo apresenta a utilização de AuNPs 100 nm e Au-SHINs 100 nm recobertas com 4 nm de sílica na detecção do herbicida ametrina (AMT) via SERS. Medidas de SERS foram realizadas em dois sistemas distintos: i) suspensão coloidal de AuNPs ou Au-SHINs contendo solução etanólica de AMT, de forma que a concentração final da AMT foi de 10^{-5} mol/L; e ii) detecção de uma variada faixa de concentração de AMT em etanol (de 10^{-3} a 10^{-8} mol/L) borrifada em cana-de-açúcar, e posterior aplicação das AuNPs ou Au-SHINs, objetivando simular um sistema próximo ao real.

7.1. Medidas de SERS em solução de ametrina

Medidas de SERS para detecção do herbicida AMT em solução (concentração final 10^{-5} mol/L) foram realizadas utilizando AuNPs 100 nm e Au-SHINs 100 nm recobertas com sílica por 1 hora. A caracterização morfológica das AuNPs e Au-SHINs foi realizada a partir das imagens de MET apresentadas na Figura 55.

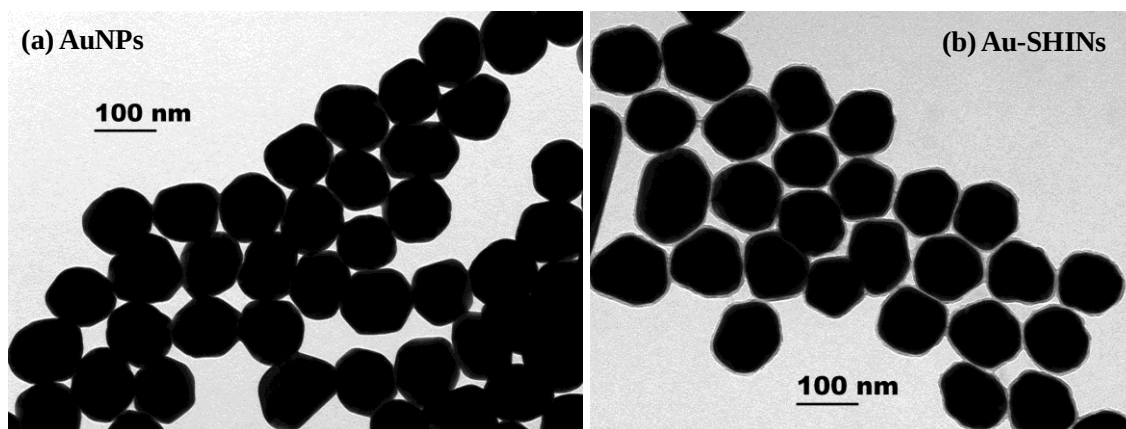


Figura 55: imagens de MET para os coloides de (a) AuNPs 100 nm e (b) Au-SHINs 100 nm recobertas com sílica por 1 hora.

O diâmetro médio das AuNPs e a espessura da camada de sílica das Au-SHINs foram determinados via histogramas construídos a partir das imagens de MET (Figura 55). As AuNPs e Au-SHINs têm diâmetro médio de 102 ± 4 nm e o recobrimento de sílica das Au-SHINs tem uma espessura média de 4 ± 1 nm. Os valores encontrados estão coerentes com os relatados na literatura.^{46,153} Li et al.,⁴⁶ os quais desenvolveram as metodologias de preparação das AuNPs com diâmetros grandes e o recobrimento dessas nanopartículas com camadas ultrafinas de sílica, reportaram AuNPs com diâmetros de ~ 120 nm e recobrimentos com espessuras de 4 nm.

Na Figura 56 tem-se os espectros de extinção das AuNPs e Au-SHINs bem como da solução de AMT em etanol (10^{-5} mol/L) e das AuNPs e Au-SHINs contendo AMT com concentração final de 10^{-5} mol/L.

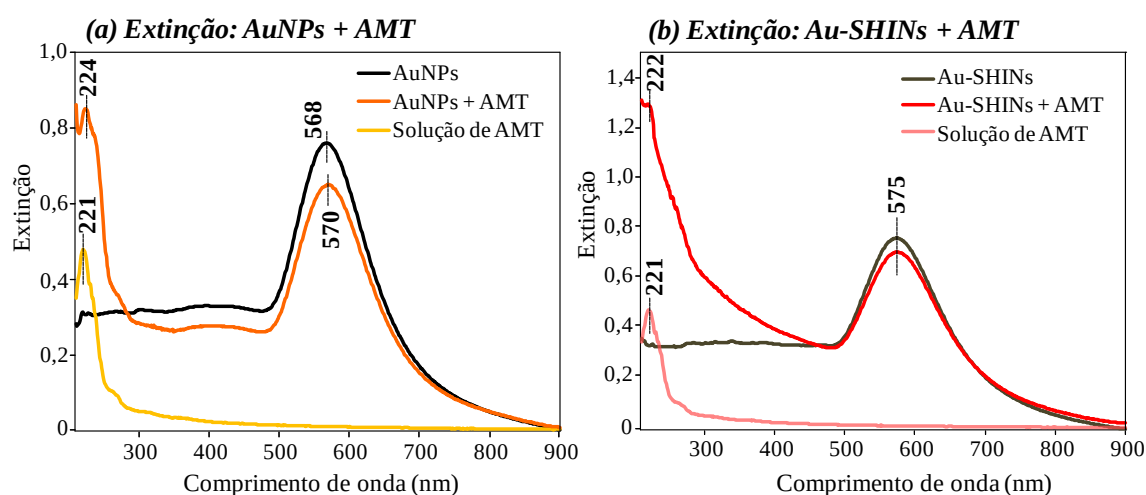


Figura 56: espectros de extinção para os coloides (a) AuNPs 100 nm e (b) Au-SHINs 100 nm com 4 nm de recobrimento. Os espectros da solução de AMT e dos coloides com AMT também estão mostrados. Em todos os casos a concentração de AMT é 10^{-5} mol/L.

Comparando-se os espectros de extinção do coloide AuNPs puro com o espectro das AuNPs + AMT (Figura 56a), nota-se nesse último, a presença de uma banda em 224 nm, atribuída a transições $\pi-\pi^*$ do anel s-triazínico presente em derivados triazínicos.^{154,155} Tal atribuição é confirmada no espectro de extinção da solução de

AMT, onde a banda característica dos derivados triazínicos está localizada em 221 nm. O deslocamento dessa banda associado ao deslocamento e ao alargamento do *plasmon* de extinção das AuNPs na solução de AuNPs + AMT (de 568 nm nas AuNPs para 570 nm nas AuNPs + AMT e FWHM de 91 nm para 100 nm) podem estar relacionados a agregação das nanopartículas ou à mudanças no ambiente ao redor delas.^{78,156} Tais efeitos são observados como consequência da adsorção de analitos na superfície das nanopartículas.^{78,156} No primeiro caso, a agregação das nanopartículas é induzida pela presença de moléculas de um dado analito ou de um sal iônico, surgindo um segundo *plasmon* próximo a 725 nm.⁹⁷ Tal efeito foi observado por Furini et al.¹⁵⁷ ao adicionar o fungicida carbendazim em uma suspensão coloidal de AgNPs contendo KNO₃. No segundo caso, mudanças no ambiente no qual as nanopartículas estão inseridas, seja pela troca de solvente ou pela presença de um analito, resulta em mudanças sutis no *plasmon* de extinção, como pequenos deslocamentos e/ou alargamentos no pico máximo do *plasmon*.¹⁵⁶ Portanto, as mudanças observadas no *plasmon* de extinção das AuNPs (Figura 56a) são um efeito da mudança no ambiente ao redor delas, causada pela adsorção das moléculas de AMT na superfície das AuNPs.

Por outro lado, ao compararmos os espectros de extinção do coloide Au-SHINs puro com o espectro das Au-SHINs + AMT (Figura 56b), o efeito de deslocamento das bandas referentes a AMT e do *plasmon* de extinção das Au-SHINs é pouco significativo ou não observado. Além disso, o alargamento do *plasmon* das Au-SHINs é pouco pronunciado (FWHM de 98 nm nas Au-SHINs para 103 nm nas Au-SHINs + AMT). Vale lembrar que as Au-SHINs estão recobertas por uma camada de sílica com espessura de 4 nm. Esse recobrimento atua na “proteção” e na dispersão das nanopartículas, evitando que elas estejam em contato direto com analitos que possam degradá-las e dispersando-as de forma homogênea em solventes orgânicos.^{153,158}

Portanto, provavelmente, essa camada inerte em torno das Au-SHINs impede uma adsorção mais efetiva das moléculas de AMT ao redor das Au-SHINs, resultando em mudanças poucos significativas do ambiente ao redor delas, o que confirma os resultados observados no *plasmon* das Au-SHINs (Figura 56b).

O espectro Raman da AMT (pó) e os espectros SERS da AMT em etanol (10^{-4} mol/L) e então diluída nos coloides (10^{-5} mol/L) de AuNPs 100 nm e Au-SHINs 100 nm com 4 nm de recobrimento (espessura da camada sílica) estão apresentados na Figura 57. As atribuições dos modos vibracionais, característicos da AMT, para as respectivas bandas Raman e SERS observadas na Figura 57 constam na Tabela 7.

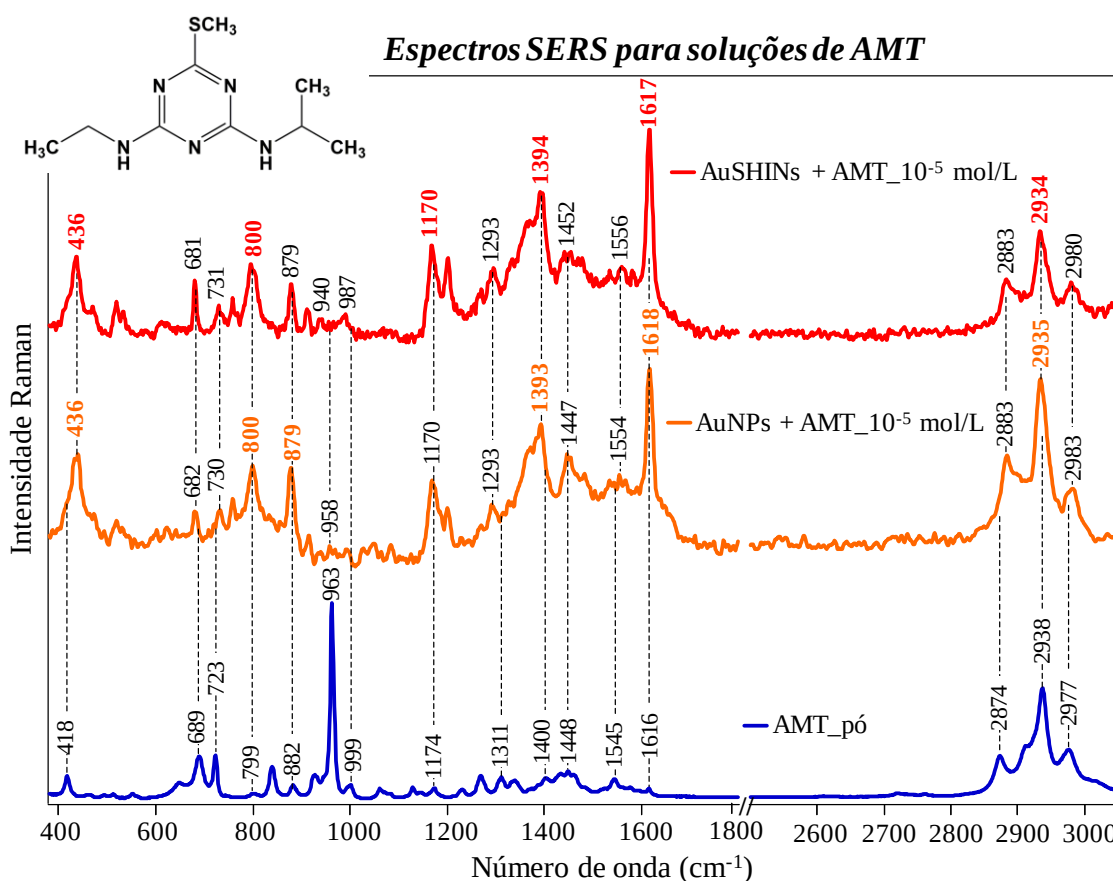


Figura 57: espectro Raman da AMT (pó) e espectros SERS da AMT em solução com coloide de AuNPs 100 nm (AuNPs + AMT) e Au-SHINs 100 nm recobertas com 4 nm de sílica (Au-SHINs + AMT). Nos espectros SERS a concentração final de AMT é 10^{-5} mol/L. As medidas foram realizadas com linha de laser em 633 nm e as bandas SERS de maior amplificação estão destacadas nos espectros. *Inset:* estrutura molecular da AMT.

Tabela 7: atribuições vibracionais para as bandas Raman (pó da AMT) e SERS (AuNPs + AMT e Au-SHINs + AMT) características da AMT.

AMT pó (cm ⁻¹)	AuNPs+AMT (cm ⁻¹)	Au-SHINs+AMT (cm ⁻¹)	Atribuições
418	436	436	Deformação CNC + CSC ¹⁶
689	682	681	Estiramento S-CH ₃ ¹⁵⁹
723	730	731	Estiramento C-S ¹⁵⁹
799	800	800	Deformação CN do anel fora do plano + CH ₃ <i>twisting</i> ¹⁶
882	879	879	Estiramento CN do anel e S-C + CH ₃ <i>twisting</i> ¹⁶
963	958	940	Estiramento CN de respiração do anel ¹⁶⁰
999	-	987	CH ₃ <i>twisting</i> + estiramento CN do anel ¹⁶
1174	1170	1170	Deformação CC + CH ₃ <i>twisting</i> ¹⁶
1311	1293	1293	Estiramento CN do anel + deformação CH e NH ¹⁶
1400	1393	1394	Estiramento CN do anel ¹⁶¹
1448	1447	1452	Deformação NH e CH ₂ + estiramento CN ¹⁶
1545	1554	1556	Estiramento CN do anel + deformação NH ¹⁶
1616	1618	1617	Estiramento CN do anel + deformação NH ¹⁶
2874	2884	2883	Estiramento C-H da cadeia lateral ²⁰
2938	2934	2934	Estiramento C-H da cadeia lateral ²⁰
2977	2984	2980	Estiramento simétrico + assimétrico C-H da cadeia lateral ²⁰

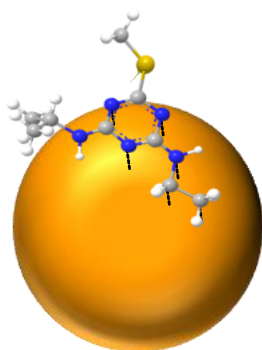
As duas principais bandas de maior amplificação no espectro SERS da AMT, tanto em coloide de AuNPs como em Au-SHINs, estão em 1617 e 1394 cm⁻¹, atribuídas a estiramento C-N do anel + deformação N-H ¹⁶ e estiramento C-N do anel.¹⁶¹ Tais características sugerem que em ambos os casos (AuNPs e Au-SHINs) as moléculas de

AMT adsorvem sobre a superfície das AuNPs via anel triazínico, estando os grupos N–H e C–H da cadeia lateral muito próximos à superfície das AuNPs. De acordo com Costa et al.,¹⁶² o grupo lateral isopropílico causa um impedimento estérico, dificultando a aproximação das AuNPs nessa região da molécula. Portanto, os grupos N–H e C–H que estão próximos à superfície das AuNPs devem ser os referentes à cadeia lateral etílica.

Em SERS, a amplificação do sinal depende da distância entre os grupos moleculares e as nanopartículas e da orientação molecular.^{3,4,78} Dessa forma, a posição (orientação) das moléculas na superfície das nanopartículas é determinada considerando as regras de seleção de superfície,^{3,4,78} já detalhadas no capítulo 4. Alguns trabalhos relatam distintas orientações moleculares para derivados triazínicos.^{16,20,162–164} Dentre eles, destacam-se os trabalhos de Santos Costa et al.¹⁶ e Rubira et al.,²⁰ os quais reportam, respectivamente, a detecção de baixas concentrações de AMT (5×10^{-7} mol/L) utilizando nanobastões de ouro (AuNRs) e nanocubos de prata (AgNCs)¹⁶ e diferentes concentrações de prometrina (PRM, 5×10^{-7} mol/L a 5×10^{-12} mol/L) utilizando nanopartículas de prata (AgNPs).²⁰ Santos Costa et al.¹⁶ verificaram que as moléculas de AMT estavam adsorvidas sobre as AuNRs e as AgNCs com o plano do anel triazínico perpendicular à superfície metálica devido a maior amplificação da banda em 963 cm^{-1} , característica de estiramento de respiração do anel triazínico.¹⁶⁰ Por outro lado, a drástica diminuição dessa mesma banda, quando comparado o espectro SERS de soluções de PRM com o espectro do pó, levaram Rubira et al.²⁰ a concluir que as moléculas de PRM estavam adsorvidas sobre a superfície de AgNPs com o plano do anel triazínico paralelo a superfície metálica. No primeiro caso (Santos Costa et al.-AMT), o dipolo do modo vibracional de respiração do anel triazínico é paralelo ao campo eletromagnético local ($\vec{E}_{\text{local}}$), resultando em máxima amplificação do sinal

SERS, enquanto no segundo caso (Rubira et al. – PRM), este mesmo dipolo é perpendicular ao $\vec{E}_{\text{local}}$, resultando em mínima ou nenhuma amplificação do sinal SERS.^{3,4,78} No nosso caso, essa mesma banda pode ser utilizada para determinar a orientação molecular da AMT nas AuNPs e Au-SHINs. Como praticamente não se nota tal banda no espectro SERS das AuNPs +AMT e Au-SHINs + AMT, pode-se concluir que as moléculas de AMT adsorvem preferencialmente via anéis triazínicos, como discutido anteriormente para Rubira et al.,²⁰ com o plano dos anéis paralelo às superfícies metálicas. Na Figura 58 tem-se representações esquemáticas da adsorção das moléculas de AMT sobre a superfície das AuNPs e Au-SHINs considerando as bandas de maior amplificação nos espectros SERS da Figura 57 e as regras de seleção de superfície para o efeito SERS.

(a) Adsorção de AMT sobre AuNPs



(b) Adsorção de AMT sobre Au-SHINs

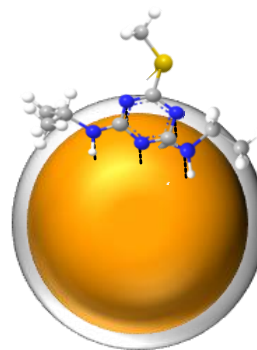


Figura 58: representação esquemática da adsorção da AMT sobre a superfície das (a) AuNPs e (b) Au-SHINs. Em ambos os casos as moléculas de AMT adsorvem, preferencialmente, via anéis triazínicos paralelos a superfície das nanopartículas, com os grupos N–H e C–H da cadeia lateral etílica também próximos à superfície das AuNPs e Au-SHINs. O esquema está fora de escala quando comparada as dimensões das nanopartículas e da AMT.

7.2. Medidas de SERS em cana-de-açúcar

Medidas de SERS foram realizadas para diferentes concentrações de AMT em etanol borrifadas em cana-de-açúcar, atingindo uma faixa de 10^{-3} a 10^{-8} mol/L. Os

espectros SERS da maior concentração, 10^{-3} mol/L, foram obtidos utilizando AuNPs 100 nm e Au-SHINs 100 nm recobertas com 4 nm de sílica. Os resultados estão apresentados na Figura 59 juntamente com os espectros Raman da cana-de-açúcar (SC), cana-de-açúcar + AMT 10^{-3} mol/L (SC + AMT), cana-de-açúcar + AuNPs (SC + AuNPs) e cana-de-açúcar + Au-SHINs (SC + Au-SHINs).

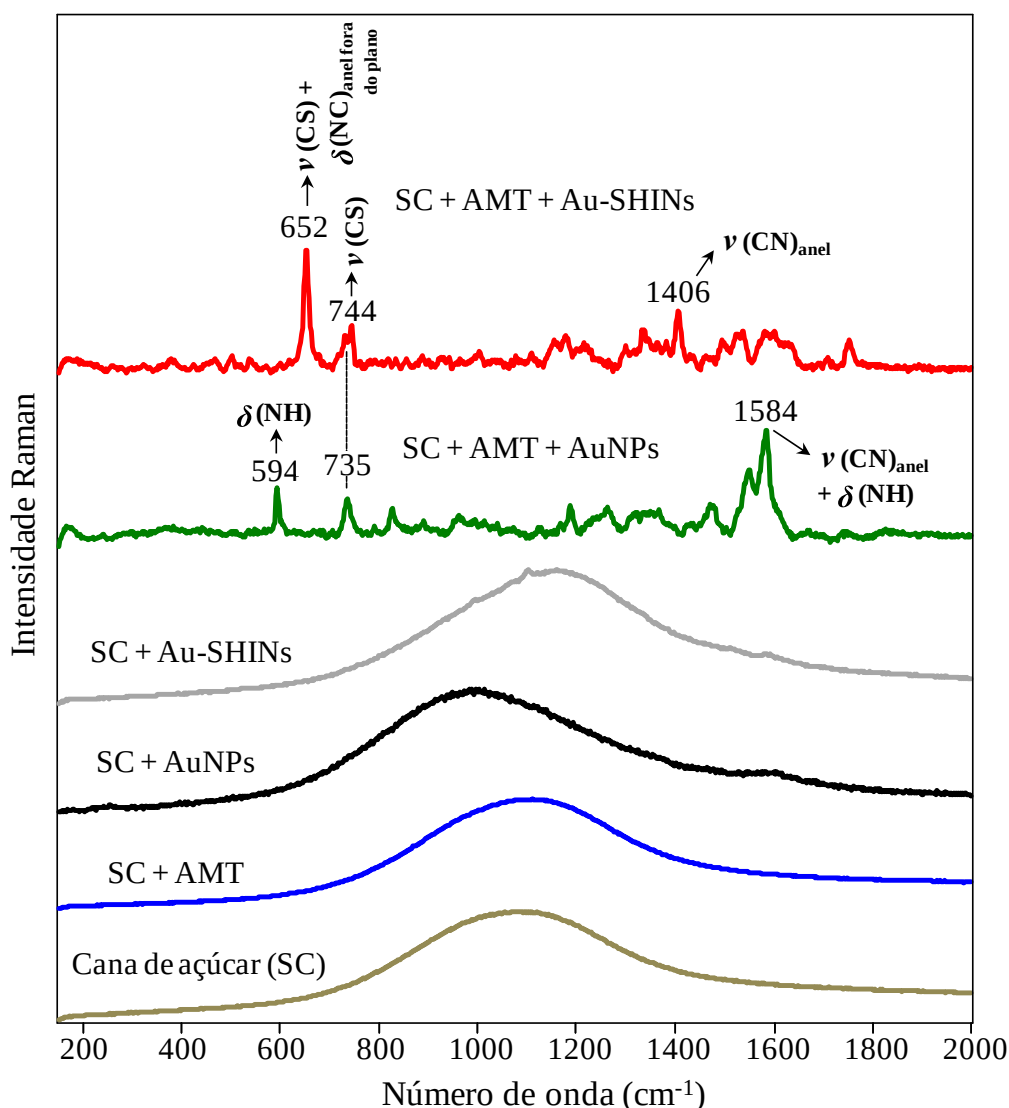


Figura 59: espectros Raman da cana-de-açúcar (SC), cana-de-açúcar + AMT 10^{-3} mol/L em etanol (SC + AMT), cana-de-açúcar + AuNPs (SC + AuNPs) e cana-de-açúcar + Au-SHINs (SC + Au-SHINs) e espectros SERS da AMT (10^{-3} mol/L em etanol) em cana-de-açúcar após adição dos coloides AuNPs (SC + AMT + AuNPs) e Au-SHINs (SC + AMT + Au-SHINs) obtidos com linha de laser em 633 nm. A AMT foi borrifada e os coloides gotejados sobre a cana (5 μL).

Como observado nos espectros SERS da Figura 59, as bandas de maior amplificação para a amostra de cana-de-açúcar contendo AMT (10^{-3} mol/L em etanol) e AuNPs (SC + AMT + AuNPs) estão em 594, 735 e 1584 cm^{-1} , sendo atribuídas à deformação N-H,¹⁶ ao estiramento C-S¹⁵⁹ e ao estiramento C-N do anel + deformação N-H,¹⁶ respectivamente. Nesse caso, as bandas predominantes estão relacionadas aos grupos N-H e ao anel triazínico. Já na amostra de cana-de-açúcar contendo AMT em etanol (10^{-3} mol/L) e Au-SHINs (SC + AMT + Au-SHINs), as bandas amplificadas estão em 652, 744 e 1406 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C-S + deformação N-C do anel fora do plano,¹⁶ ao estiramento C-S¹⁵⁹ e ao estiramento C-N do anel,¹⁶¹ respectivamente, predominando assim o grupo C-S e o anel triazínico. Portanto, fica evidente as diferenças na adsorção das moléculas de AMT sobre as distintas superfícies metálicas: AuNPs e Au-SHINs. No primeiro caso (SC + AMT + AuNPs), a adsorção se dá via grupos N-H e anel triazínico e no segundo (SC + AMT + Au-SHINs), a adsorção ocorre através do grupo C-S e anel triazínico.

Diferenças na adsorção das moléculas de AMT sobre as nanopartículas são observadas quando comparados os dois sistemas de detecção: AMT em cana-de-açúcar e AMT em solução (seção 7.1 desse capítulo). Neste último, a AMT é dissolvida em etanol e então diluída nos coloides, o que favorece a adsorção da AMT sobre as nanopartículas metálicas, enquanto que na cana-de-açúcar a solução de AMT em etanol é borrifada e após um tempo de secagem, um volume de coloide AuNPs ou Au-SHINs é adicionado sobre a superfície, dificultando a adsorção da AMT sobre as nanopartículas. Além disso, as diferenças nos mecanismos de adsorção das moléculas de AMT são causa das mudanças dos espectros SERS para cada tipo de nanopartícula (AuNPs ou Au-SHINs), em cada sistema (cana-de-açúcar ou solução). Variações nos espectros SERS

são tipicamente observadas e justificáveis pela mudança local do ambiente molecular.^{4,97,165}

Outro aspecto importante da Figura 59 é com relação ao *background* de fluorescência notado nos espectros Raman da cana-de-açúcar, cana-de-açúcar + AMT, cana-de-açúcar + AuNPs e cana-de-açúcar + Au-SHINs. Fang et al.¹⁹ também notaram um *background* de fluorescência ao trabalharem com a detecção do pesticida paraquat na superfície de frutas como pera e maçã. Segundo os autores, o intenso *background* de fluorescência, verificado nos espectros Raman dessas frutas, diminui a capacidade de detecção via SERS.¹⁹ Em nosso caso, o *background* de fluorescência proveniente da cana-de-açúcar, diminui a capacidade de detecção via SERS para concentrações mais baixas de AMT. Por exemplo, concentrações de AMT abaixo de 10^{-3} mol/L não são detectadas utilizando as Au-SHINs. Embora o recobrimento não seja tão espesso (~ 4 nm de sílica) a ponto de eliminar o sinal SERS, uma vez que o sinal desaparece apenas para distâncias maiores que 15 nm,⁴ tal característica associada ao *background* de fluorescência da cana-de-açúcar dificulta a detecção das demais concentrações de AMT (10^{-4} a 10^{-8} mol/L) utilizando as Au-SHINs.

Na Figura 60 tem-se os espectros SERS para as diferentes concentrações de AMT em etanol (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , $5,3 \times 10^{-8}$ e 10^{-8} mol/L) detectadas em cana-de-açúcar utilizando as AuNPs 100 nm. As bandas de maior amplificação e coincidentes entre as diferentes concentrações estão destacadas nos espectros, e seus respectivos modos vibracionais atribuídos na Tabela 8.

Espectros SERS para AMT em cana-de-açúcar

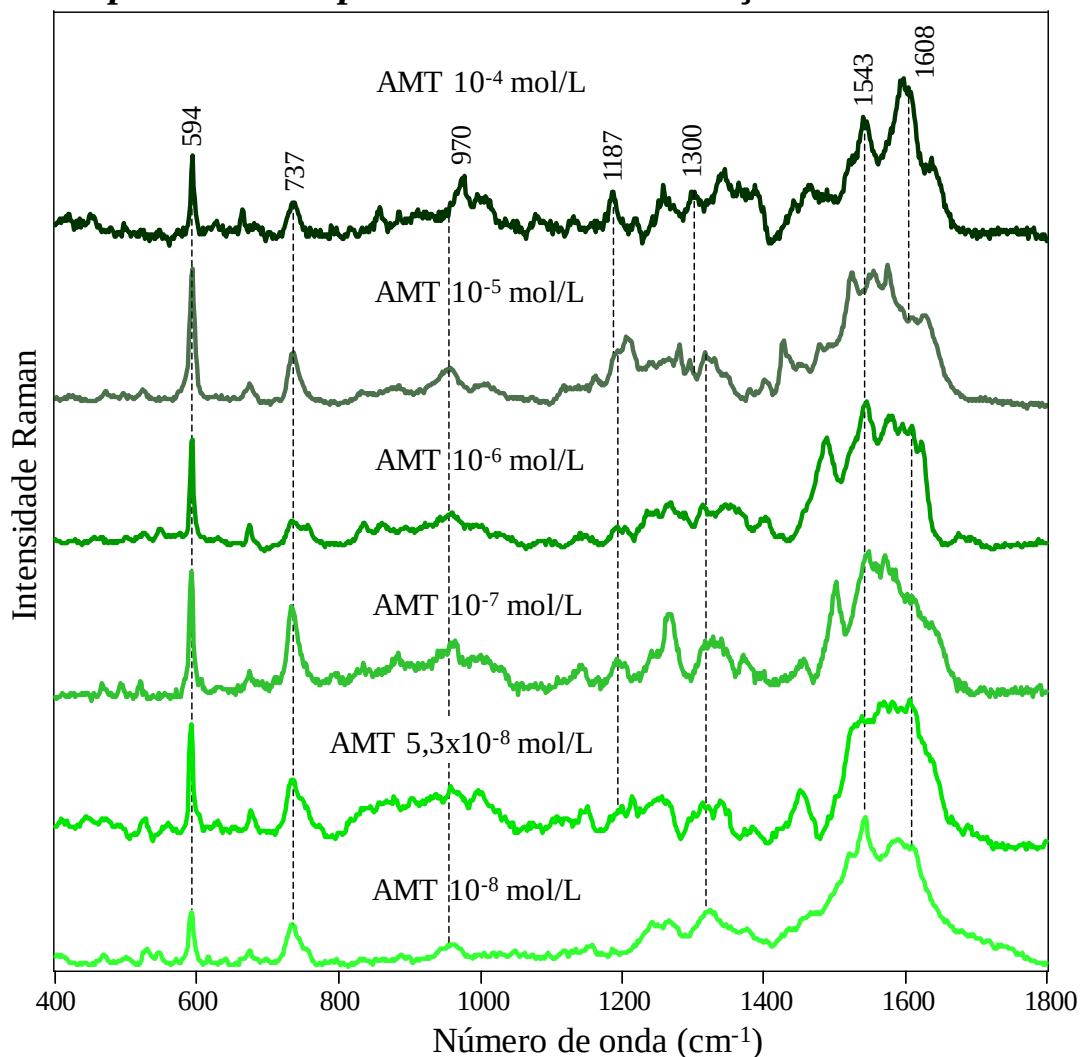


Figura 60: espectros SERS para diferentes concentrações de AMT dissolvida em etanol e borrifada em cana-de-açúcar, e posterior adição de AuNPs 100 nm (gotejamento - 5 μL). A intensidade Raman (eixo Y) está normalizada.

Como observado nos espectros da Figura 60, a metodologia aplicada nesse trabalho, baseada no efeito SERS, permitiu a detecção de diferentes concentrações de AMT sobre a superfície da cana-de-açúcar. A faixa de concentração analisada (10^{-3} a 10^{-8} mol/L) possibilitou alcançar o limite máximo de resíduos (MRLs) de AMT permitido em produtos agrícolas como abacaxi, milho, grãos de café e cana-de-açúcar. O valor regulamentado em alguns países e aplicado pela ANVISA é de 0,05 mg/kg, ou seja, 0,05 mg de AMT por kg de produto,²⁶ o qual corresponde a concentração de $5,3 \times$

10^{-8} mol/L de AMT em cana-de-açúcar (vide Figura 60). Embora a detecção de pesticidas via SERS tem sido reportada em diversos trabalhos na literatura,^{19,20,166–168} o grande desafio é o desenvolvimento de metodologias ultrasensíveis, capazes de detectar baixas concentrações em produtos agrícolas brutos, como na superfície de frutas, verduras, grãos, entre outros.^{19,153} Mais especificamente no caso da AMT, poucos trabalhos têm relatado a detecção desse herbicida e de seus resíduos, seja em solução,^{16,18} considerando o limite de potabilidade da água ($63 \mu\text{g/L} = 2,77 \times 10^{-7}$ mol/L),¹⁶⁹ seja em produtos agrícolas,¹⁷⁰ considerando o MRLs regulamentado ($0,05 \text{ mg/kg}$).²⁶ As baixas concentrações de AMT detectadas em nosso trabalho são comparáveis com o que tem sido relatado na literatura via técnica SERS: com valores de detecção de 3×10^{-7} mol/L em suspensão aquosa de AMT adsorvida sobre nanobastões de ouro e nanocubos de prata;¹⁶ SERS acoplado a modelos quimiométricos: com limite de quantificação de 9×10^{-4} mol/L de AMT em água de rio, utilizando nanopartículas esféricas de ouro,¹⁸ e através de um método espectrofotométrico baseado na reação com piridina e posterior mistura com ácido sulfanílico, onde um limite de detecção de $0,16 \mu\text{g/mL}$, correspondente a 7×10^{-7} mol/L foi alcançado em cana-de-açúcar.¹⁷⁰ Portanto, a metodologia SERS aplicada nesse trabalho apresenta um melhor desempenho no que diz respeito a detecção de AMT em cana-de-açúcar, atingindo a mais baixa concentração até então detectada diretamente em produtos agrícolas (1×10^{-8} mol/L em cana-de-açúcar), superando o MRLs ($5,3 \times 10^{-8}$ mol/L). Além disso, destaca-se também a versatilidade do método SERS, que quando comparado ao espectrofotométrico, demanda menos tempo e representa menor complexidade, baseando-se, basicamente, na adição do coloide sobre a superfície contaminada com o herbicida e posterior aquisição do espectro SERS.

Tabela 8: atribuições vibracionais das bandas SERS observadas para as diferentes concentrações de AMT detectadas em cana-de-açúcar utilizando AuNPs 100 nm.

10^{-4} mol/L (cm^{-1})	10^{-5} mol/L (cm^{-1})	10^{-6} mol/L (cm^{-1})	10^{-7} mol/L (cm^{-1})	$5,3 \times 10^{-8}$ mol/L (cm^{-1})	10^{-8} mol/L (cm^{-1})	Atribuições
594	594	594	592	592	593	Deformação NH^{16}
737	737	735	735	734	735	Estiramento C-S^{159}
970	958	959	961	960	958	Estiramento CN de respiração do anel ¹⁶⁰
1187	1190	1190	1192	1192	-	Deformação CC + CH_3 twisting ¹⁶
1300	1315	1314	1315	1314	1320	Estiramento CN do anel + deformação CH e NH^{16}
1543	1551	1545	1546	1547	1543	Estiramento CN do anel + deformação NH^{16}
1608	1611	1610	1609	1607	1609	Estiramento CN do anel + deformação NH^{16}

As três principais bandas de maior amplificação, observadas nos espectros SERS das diferentes concentrações de AMT em cana-de-açúcar (Figura 60), estão em aproximadamente 594, 1543 e 1608 cm^{-1} , referentes à deformação N–H e estiramento CN do anel + deformação N–H,¹⁶ respectivamente. Outras duas bandas que merecem destaque estão em 737 e 970 cm^{-1} , atribuídas a estiramento C-S^{159} e estiramento CN de respiração do anel,¹⁶⁰ respectivamente. A presença dessa primeira banda sugere que o dipolo do estiramento C-S é paralelo ao campo eletromagnético local ($\vec{E}_{\text{local}}$).^{3,4,78} Já a presença da banda em 970 cm^{-1} elimina a possibilidade das moléculas de AMT estarem adsorvidas com o plano do anel triazínico paralelo a superfície das AuNPs,^{16,20} uma vez que dessa forma o estiramento de respiração do anel estaria perpendicular ao $\vec{E}_{\text{local}}$. Portanto, considerando as bandas amplificadas nos espectros SERS (Figura 60) e as regras de seleção de superfície para o efeito SERS,^{3,4,78} pode-se inferir que, no caso da detecção em cana-de-açúcar, a AMT está adsorvida preferencialmente via grupos laterais N–H e anel triazínico com o plano do anel perpendicular (inclinado ou não) à

superfície das AuNPs e o dipolo da vibração C–S paralelo ao $\vec{E}_{\text{local}}$, como proposto na Figura 61. Portanto, diferente da orientação quando em solução etanólica diluída nos coloides, onde predomina uma orientação paralela.

Adsorção de AMT sobre AuNP detectada em cana-de-açúcar

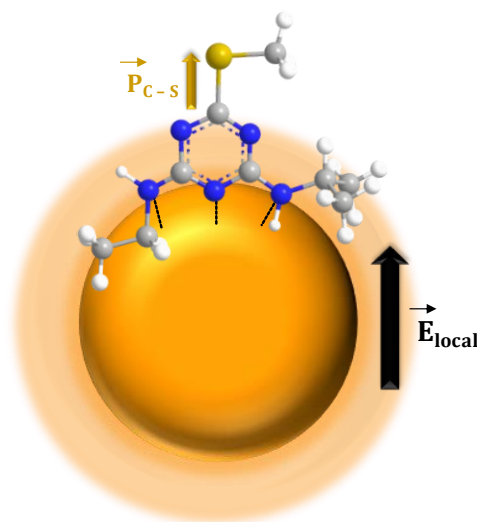


Figura 61: proposta para a adsorção e orientação da AMT sobre AuNPs, nas diferentes concentrações detectadas em cana-de-açúcar, considerando as bandas amplificadas nos espectros SERS (Figura 60) e as regras de seleção de superfície SERS. O campo eletromagnético local ($\vec{E}_{\text{local}}$) e o dipolo do modo vibracional C–S ($\vec{P}_{\text{C-S}}$) também estão representados na figura. O esquema está fora de escala quando comparada as dimensões das AuNPs e da AMT.

Complementarmente aos resultados de detecção via SERS, um estudo de degradação foi realizado a fim de verificar se as diferenças observadas entre o espectro Raman do pó da AMT (adquirida da Sigma-Aldrich) e os espectros SERS da AMT em cana-de-açúcar provinham da forma como as moléculas de AMT adsorvem sobre as nanopartículas metálicas (orientação e grupo químico) e/ou de produtos de degradação da AMT. Tal estudo se deu a partir da purificação da AMT: 14 mg do herbicida ametrina (AMT), adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich, foram dispersos em 1 mL de água ultrapura em um e-pondorf de 1,5 mL. A suspensão foi colocada em sonificação por 1 hora e posteriormente centrifugada a 11.200 g por 10 minutos,

separando as fases sobrenadante e precipitado. Os possíveis produtos degradados, solubilizados em água ultrapura devido a alta solubilidade dos compostos desalquilados neste solvente,¹⁷¹ foram separados por centrifugação, ficando retidos no sobrenadante. O produto purificado, também separado por centrifugação, ficou retido no precipitado devido a baixa solubilidade da AMT em água (1,85 mg/mL).¹⁶⁹ O sobrenadante (produto degradado) foi removido (com uma micropipeta) e o precipitado (produto purificado) colocado sobre uma placa de vidro para secagem e posterior realização das medidas Raman. A subtração do espectro do pó da AMT (AMT pura + produto degradado) pelo produto purificado (correspondente a AMT pura) nós dará o espectro do produto degradado.

Na Figura 62 tem-se a análise comparativa entre os espectros Raman do pó da AMT, adquirida da Sigma-Aldrich (Figura 62a), do precipitado desse mesmo pó após dispersão em água ultrapura e centrifugação (produto purificado, Figura 62b), e da subtração do espectro da Figura 62a pela 62b (Figura 62c), que seria referente aos produtos degradados. O espectro SERS da AMT (conforme adquirida da Sigma-Aldrich, sem nenhuma purificação prévia.) em cana-de-açúcar na concentração correspondente ao MRLs ($5,3 \times 10^{-8}$ mol/L) é dado na Figura 62d.

A análise comparativa entre os espectros da Figura 62 confirma a maior similaridade do espectro SERS da AMT em cana-de-açúcar $5,3 \times 10^{-8}$ mol/L (Figura 62d) com o espectro Raman da subtração (a – b) (Figura 62c). Embora, esse último possa ser atribuído aos produtos degradados, presentes em quantidades traços na AMT adquirida da Sigma-Aldrich, uma mistura de AMT pura e produto degradado pode compor esse espectro, uma vez que a AMT é solúvel em água (1,85 mg/ mL)¹⁶⁹ assim como os produtos degradados.¹⁷¹ Isto também explica a similaridade entre os espectros

Raman da subtração ($a - b$) (Figura 62c) e do precipitado (produto purificado) (Figura 62b).

Outro importante destaque são as bandas em aproximadamente $1200\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, mais evidentes nos espectros da Figura 62c e 62d, sugerindo que as bandas observadas no espectro SERS da AMT em cana-de-açúcar nessa região são provenientes dos produtos de degradação do herbicida. Já as bandas destacadas por flechas estão presentes em praticamente todos os espectros da Figura 62, e suas amplificações seriam relacionadas à orientação das moléculas de AMT adsorvidas sobre as nanopartículas metálicas,^{3,4,78} como discutido anteriormente.

Portanto, a análise comparativa entre os espectros da Figura 62 permite inferir que as diferenças espectrais observadas no espectro SERS da AMT em cana-de-açúcar ($5,3 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$) provém dos produtos de degradação, que embora presentes em quantidades traços na AMT da Sigma-Aldrich resultam em significativos espectros SERS, e da forma como as moléculas de AMT pura estão adsorvidas sobre a superfície das nanopartículas metálicas.

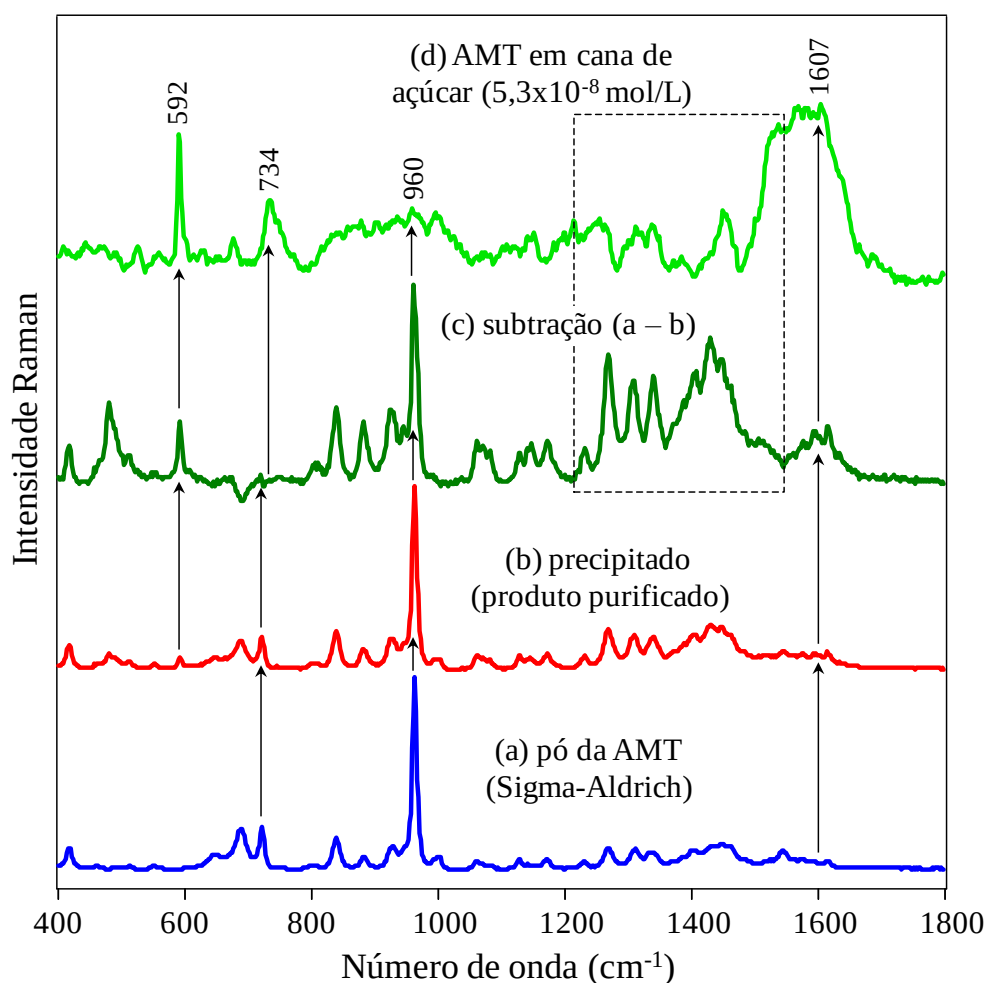


Figura 62: espectros Raman (a) do pó da AMT (Sigma-Aldrich, sem qualquer purificação), (b) do precipitado desse mesmo pó após dispersão em água ultrapura e centrifugação (produto purificado) e (c) da subtração do espectro (a) pelo (b). (d) Espectro SERS da AMT, adquirida da Sigma-Aldrich, em cana-de-açúcar ($5,3 \times 10^{-8}$ mol/L). Para as medidas de SERS foi utilizada a AMT conforme adquirida da Sigma-Aldrich, sem nenhuma purificação prévia. Para as medidas em solução a AMT foi solubilizada em etanol e depois adicionada às soluções coloidais de AuNPs e Au-SHINs. Para as medidas em cana-de-açúcar a AMT foi solubilizada em etanol, borrifada na cana-de-açúcar, depois o coloide foi gotejado sobre essa superfície da cana, já contendo AMT, e então as medidas foram realizadas.

Capítulo 8

8. Aplicação biológica: imunoensaios de fluorescência amplificada em superfície e de espalhamento Raman amplificado em superfície

Esse capítulo apresenta o desenvolvimento e aplicação de duas plataformas de imunoensaio distintas: a primeira baseada no efeito SEF, para quantificação do antígeno IgM, e a segunda no efeito SERS, para detecção do antígeno do vírus da Zika. Em ambos os casos, Au-SHINs foram sintetizadas e utilizadas na preparação de SEF e SERS *tags*. A espessura da camada de sílica ao redor das nanopartículas foi ajustada de acordo com o efeito a ser observado nas plataformas: no caso do imunoensaio SEF foi crescida uma camada de sílica com ~ 10 nm, enquanto no SERS foi aplicado um recobrimento ultrafino (~ 4 nm). Uma camada de NB foi adicionada ao redor das Au-SHINs, seguida de uma camada final de sílica e funcionalizadas com anticorpos específicos. Em ambos os casos, diferentes concentrações de antígenos, IgM e Zika, foram analisadas e detectadas via mapeamentos SEF e SERS, respectivamente.

8.1. Imunoensaio utilizando *tags* de fluorescência amplificada em superfície (SEF *tags*) para quantificação de IgM

Como detalhado na seção 3.8.1 dos materiais e métodos, SEF *tags* foram preparadas a partir de Au-SHINs 100 nm, recobertas com aproximadamente 10 nm de sílica, e então aplicadas na quantificação do antígeno IgM. Anticorpos IgM são os primeiros a serem produzidos pelo nosso organismo para lidar com novas infecções. Por exemplo, imunoensaios baseados na detecção de antígenos IgM podem ser extremamente úteis no diagnóstico de doenças infecciosas em fases iniciais, como dengue e Zika.³³

8.1.1. Caracterização morfológica e espectroscópica das Au-SHINs e SEF tags

Primeiramente, AuNPs 40 nm foram sintetizadas e utilizadas como “sementes” no crescimento de AuNPs 100 nm. As imagens de MET das AuNPs 40 nm ($40 \pm 3,4$ nm de diâmetro) e AuNPs 100 nm ($102 \pm 3,8$ nm de diâmetro) estão exibidas nas Figuras 63a e 63b, respectivamente. As AuNPs 100 nm foram então recobertas com sílica, formando Au-SHINs ($102 \pm 3,8$ nm de diâmetro e $9,0 \pm 1,0$ nm de espessura de recobrimento com sílica), como mostra a imagem de MET da Figura 63c. Os espectros de extinção das nanopartículas descritas acima estão apresentados na Figura 63d.

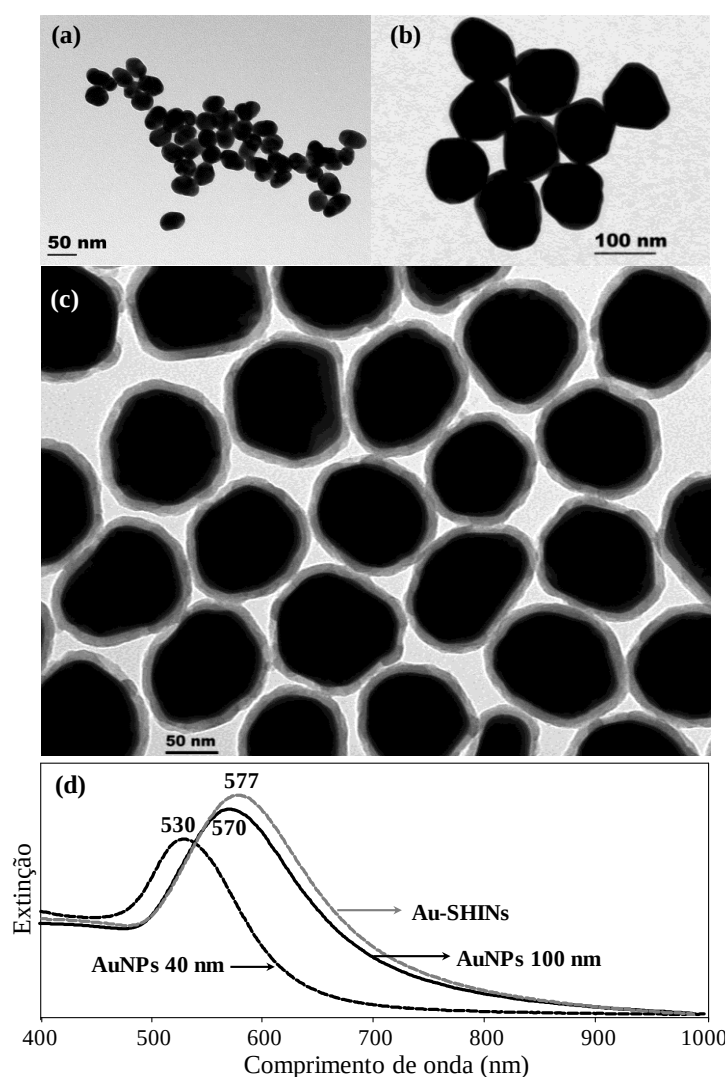


Figura 63: imagens de MET para as (a) AuNPs 40 nm ($40 \pm 3,4$ nm de diâmetro), (b) AuNPs 100 nm ($102 \pm 3,8$ nm de diâmetro) e (c) Au-SHINs ($102 \pm 3,8$ nm de diâmetro e $9,0 \pm 1,0$ nm de espessura de recobrimento com sílica). (d) Espectros de extinção das AuNPs 40 nm, AuNPs 100 nm e Au-SHINs, com *plasmon* de extinção máximo em 530, 570 e 577 nm, respectivamente.

A espessura do recobrimento com sílica nas Au-SHINs 100 nm foi ajustada para 10 nm a fim de proporcionar uma distância ótima entre nanopartícula metálica e camada fluorescente, favorecendo o efeito de amplificação da fluorescência. Como destacado na literatura,^{88,172,173} a distância metal – fluoróforo pode ser ajustada pela espessura do recobrimento com sílica ao redor das nanopartículas, permitindo uma transição contínua da supressão para a amplificação da fluorescência. Além disso, recentemente, demonstramos que Au-SHINs com diâmetros maiores (~ 100 nm) e recobertas com espessuras de sílica em torno de 10 nm, produzem maiores fatores de amplificação para a fluorescência que Au-SHINs menores (~ 40 nm),¹⁷⁴ confirmando a eficiência das Au-SHINs sintetizadas. Os espectros de extinção, exibidos na Figura 63d, mostram a dependência da ressonância localizada de *plasmon* de superfície (LSPR) com relação ao diâmetro das nanopartículas e a espessura de recobrimento com sílica. Um deslocamento significativo na LSPR é observado de 530 nm para 570 nm para as AuNPs conforme o diâmetro médio das nanopartículas aumenta de 40 nm para 100 nm. O recobrimento com sílica também causa um efeito de deslocamento para o vermelho nos valores de LSPR, de 570 nm nas AuNPs 100 nm, para 577 nm nas Au-SHINs. Neste último caso, o deslocamento na LSPR é menos pronunciado uma vez que o aumento é de apenas 10 nm, referente a espessura da camada de sílica.

A eficiência do recobrimento com sílica na amplificação da fluorescência foi validada através de experimentos com solução de NB + AuNPs 100 nm e solução de NB + Au-SHINs 100 nm com 10 nm de recobrimento. Os detalhes experimentais estão descritos na seção 3.8.1 dos materiais e métodos e os resultados mostrados na Figura 64.

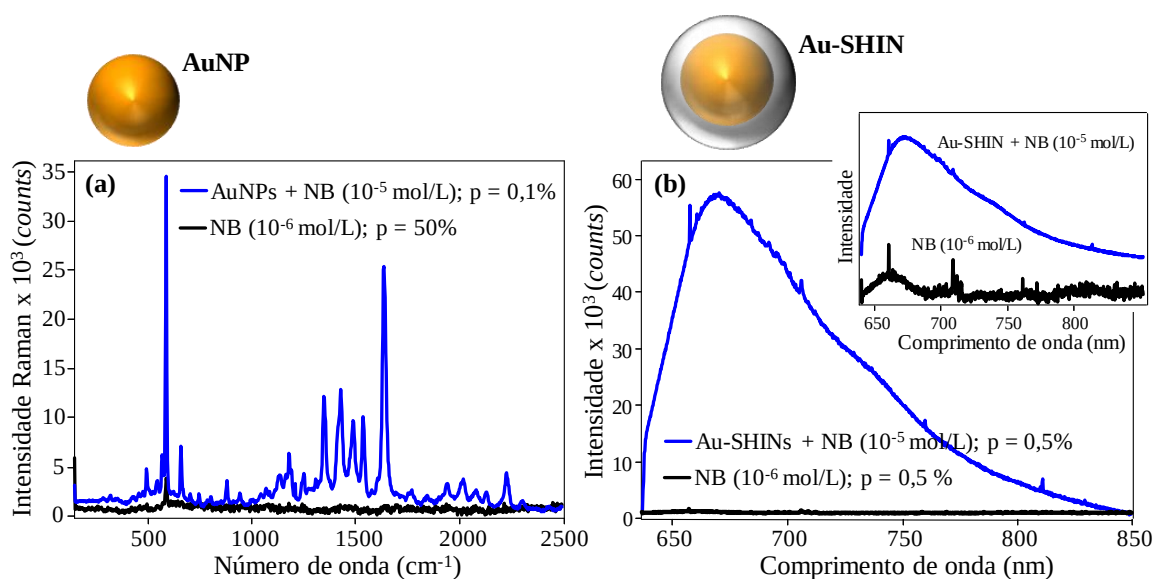


Figura 64: validação da eficiência do recobrimento com sílica na amplificação da fluorescência. Soluções de NB contendo (a) AuNPs 100 nm e (b) Au-SHINs 100 nm com 10 nm de recobrimento. Em ambos os casos a concentração final de NB é 10⁻⁶ mol/L.

Na Figura 64a, nota-se total supressão da fluorescência e o aparecimento do espectro SERRS do NB. A principal banda de amplificação no espectro SERRS está localizada em 592 cm⁻¹, atribuída ao estiramento do anel fenoxazina.^{175,176} Considerando a razão de intensidade do sinal SERRS/espalhamento Raman da banda em 592 cm⁻¹, com o espectro SERRS obtido da solução de NB + AuNPs 100 nm e o espectro Raman da solução de NB (10⁻⁶ mol/L), temos uma estimativa do EF de 4,5x10³, o que está de acordo com os EFs encontrados na literatura (10³ - 10⁹).^{4,177,178} Por outro lado, na Figura 64b nota-se a amplificação da fluorescência, com uma banda máxima em 669 nm, referente a emissão do monômero do NB.¹⁷⁹ O efeito SEF^{88,101} é observado para moléculas localizadas a uma certa distância das nanoestruturas plasmônicas, que podem interagir fortemente com os fluoróforos adjacentes, e é proporcional a E²,^{180,181} levando a EFs normalmente entre 1 e 100.¹⁸² Considerando a razão de intensidade entre o espectro SEF (registrado para a solução de NB + Au-SHINs 100 nm com 10 nm de recobrimento) e espectro de fluorescência (registrado

para a solução de NB 10^{-6} mol/L) a estimativa do EF é cerca de 70, o que está de acordo com os EFs previsto para o fenômeno de SEF a partir do mecanismo eletromagnético.^{101,182}

Nas Figuras 65a e 65b tem-se as imagens de MET das Au-SHINs 100 nm com 10 nm de recobrimento e das SEF tags, respectivamente. Os espectros de extinção dessas estruturas estão apresentados na Figura 65c, bem como o espectro de emissão de fluorescência da solução de NB 10^{-6} mol/L e o espectro SEF da suspensão coloidal de SEF tags estão mostrados na Figura 65d.

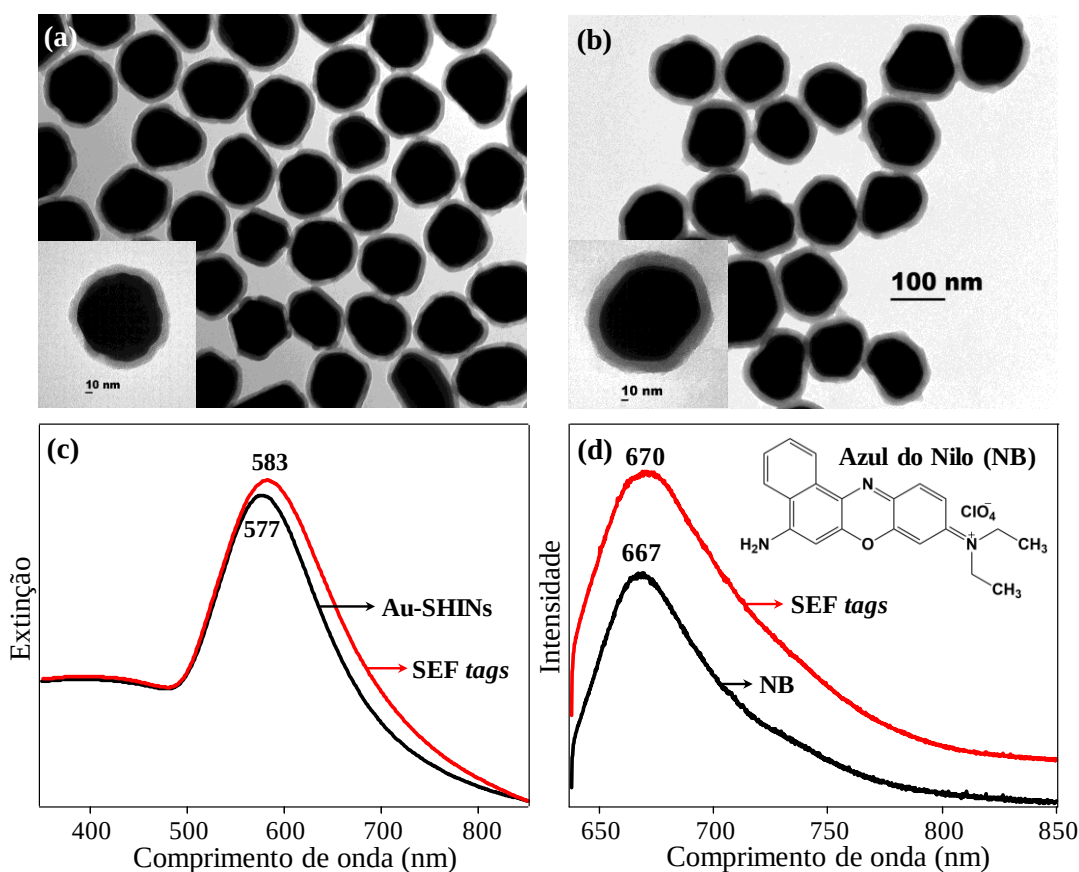


Figura 65: imagens de MET para as (a) Au-SHINs 100 nm com 10 nm de recobrimento e (b) SEF tags, mostrando o aumento na espessura da camada de sílica de $9,0 \pm 1,0$ nm para $13,4 \pm 1,4$ nm, respectivamente. (c) Espectros de extinção das Au-SHINs e SEF tags exibidas em (a) e (b), respectivamente. (d) Espectro de emissão de fluorescência para a solução de NB 10^{-6} mol/L e espectro SEF para a suspensão coloidal de SEF tags. A inserção em (d) mostra a estrutura molecular do NB.

As Figuras 65a e 65b exibem o aumento na espessura da camada de sílica de $9,0 \pm 1,0$ nm, nas Au-SHINs, para $13,4 \pm 1,4$ nm, nas SEF tags, conforme o recobrimento final de sílica envolve a camada de NB ligada quimicamente ao primeiro recobrimento com sílica. Esse aumento na espessura resulta em um pequeno deslocamento para o vermelho do máximo de extinção da LSPR, de 577 nm para 582 nm quando comparado os espectros das Au-SHINs com das SEF tags, respectivamente (Figura 65c). A comparação entre o espectro de emissão de fluorescência da solução de NB 10^{-6} mol/L e o espectro SEF da suspensão coloidal de SEF tags está mostrada na Figura 65d, onde observa-se um leve deslocamento no máximo da banda de emissão de 667 nm para 670 nm, respectivamente. Apesar desse deslocamento, ocasionado possivelmente pela mudança do ambiente químico ao qual a molécula está inserida (em solução as moléculas de NB estão solvatadas por moléculas de água enquanto nas SEF tags elas estão envolvidas entre camadas de sílica), as características espectrais verificadas nos espectros de fluorescência e SEF estão de acordo com a emissão relatada do NB em solução aquosa.¹⁸³

Após a fabricação, as SEF tags passaram por um processo de lavagem, repetido no mínimo 5 vezes, a fim de garantir que o excesso de moléculas de NB foi removido. Para tanto, a variação da intensidade de fluorescência das SEF tags foi acompanhada ao longo do processo de lavagem, como pode ser observado na Figura 66. Nos espectros das SEF tags a cada etapa de lavagem, exibidos na Figura 66, notam-se duas bandas de emissão características do NB. A primeira em 678 nm, referente a emissão do monômero, e a segunda em cerca de 740 nm, associada a emissão do dímero.^{179,184} A intensidade de fluorescência da banda de emissão do monômero (em 678 nm) diminui a cada etapa de lavagem das SEF tags, seguida da diminuição da emissão do dímero (em ca. 740 nm),^{179,184} sugerindo que o excesso de moléculas de NB agregadas ao redor das

SEF *tags* está sendo removido. Após a quinta etapa de lavagem, a intensidade de fluorescência alcança um platô (inserção da Figura 66), indicando que, a partir dessa etapa, o sinal SEF é proveniente apenas de moléculas de NB quimicamente ligadas às Au-SHINs e, portanto, o excesso de NB foi removido.

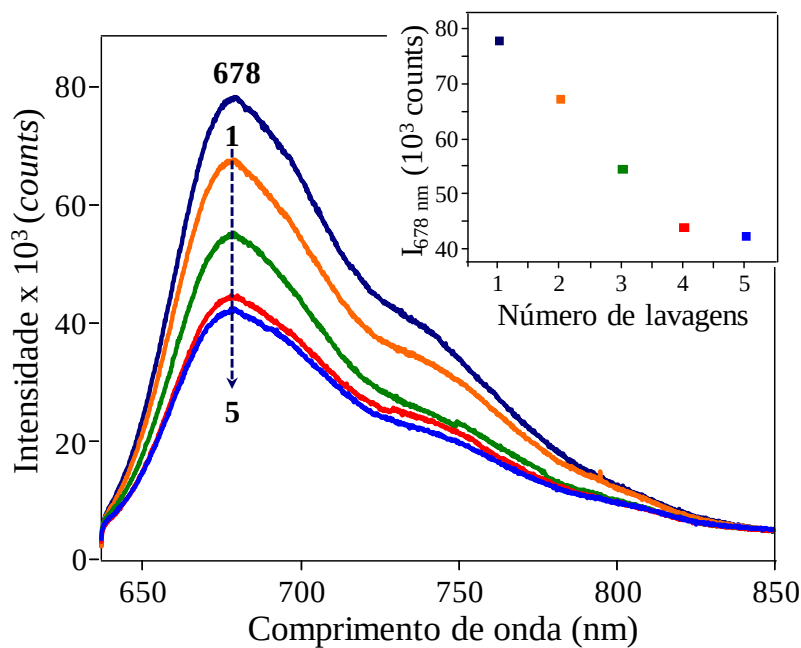


Figura 66: variação da intensidade de fluorescência da suspensão coloidal de SEF *tags* ao longo do processo de lavagem (etapas de 1 a 5). A inserção mostra a variação na intensidade da banda de emissão em 678 nm em função do número de lavagens.

8.1.2. Aplicação das SEF *tags* na quantificação do antígeno IgM

A aplicabilidade das SEF *tags* para detecção de antígenos foi verificada através da realização de experimentos de prova de conceito na determinação do antígeno IgM. O sinal das SEF *tags* foi registrado através de mapeamentos SEF para as diferentes concentrações de IgM, usando a configuração de imunoensaio sanduíche descrita na seção 3.8 dos materiais e métodos.

Na Figura 67a tem-se as respostas espectrais para um imunoensaio SEF na presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno IgM, e para dois experimentos controle: “branco” e “sem antígeno IgM”. No caso da medida do “branco”, foi registrado o espectro de anticorpos monoclonais IgM ligados ao substrato. Já a medida do controle “sem antígeno IgM” foi

realizada de forma semelhante à configuração de imunoensaio SEF, no entanto sem a presença de antígenos IgM, impossibilitando uma configuração sanduíche.

Uma questão importante na avaliação da resposta da nossa plataforma de imunoensaio sanduíche baseada em SEF *tags* para diferentes concentrações do antígeno IgM (de 100 $\mu\text{g/mL}$ a 10 ng/mL) está relacionada a uma amostragem apropriada da superfície. Em imunoenaios de fluorescência padrão, usando leitores comerciais, um certo número de pontos a serem medidos podem ser pré-definidos, tanto para melhorar as estatísticas quanto para considerar a heterogeneidade espacial do sinal de fluorescência. Similarmente, decidimos realizar mapeamentos espaciais de detecção para diferentes concentrações do antígeno IgM (de 100 $\mu\text{g/mL}$ a 10 ng/mL) presentes em regiões pré-definidas da plataforma de imunoensaio. Espectros SEF ponto-a-ponto foram coletados ao longo de uma área de 40 μm x 40 μm com passo de 3 μm , totalizando 784 espectros para cada concentração de antígeno IgM quantificada. O valor da área sob o espectro SEF foi então plotado para cada posição, gerando as imagens mapeadas mostradas nas Figuras 67b-67i.

Comparando-se os perfis espectrais dos experimentos controle e o sinal SEF do imunoensaio sanduíche na presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno IgM (Figura 67a), pode-se afirmar que (i) a emissão residual de outras espécies é insignificante em comparação com a emissão SEF; (ii) é necessária a presença de antígenos IgM para um sinal SEF legível em nossas condições experimentais. Os mapeamentos SEF, mostrados nas Figuras 67b – 67i, estão apresentados em código de cores, em que pontos mais claros referem-se a maiores intensidades de emissão SEF (áreas integradas). Imagens de mapeamento SEF mais uniformes são observadas para maiores concentrações de antígeno IgM (ex: Figura 67b). Além disso, o número de regiões com sinal SEF mais intenso diminui à medida que a concentração do antígeno IgM reduz, indicando que

menores quantidades de SEF *tags* estão sendo capturadas por região pré-definida na plataforma. Vale ressaltar a relevância clínica da faixa de concentração de antígeno IgM analisada aqui (de 100 $\mu\text{g/mL}$ a 10 ng/mL).^{112,185} Por exemplo, os testes de imunoensaio enzimático específicos para IgM da dengue e Zika têm limites de detecção de 100 $\mu\text{g/mL}$ para pacientes com infecção primária e secundária.^{33,186,187} Embora a plataforma desenvolvida aqui seja baseada em soluções de IgM diluídas em tampão PBS, as baixas concentrações de antígeno (10 ng/mL) quantificadas destacam a utilidade do fenômeno SEF no aumento dos limites de detecção em aplicações de biossensores.

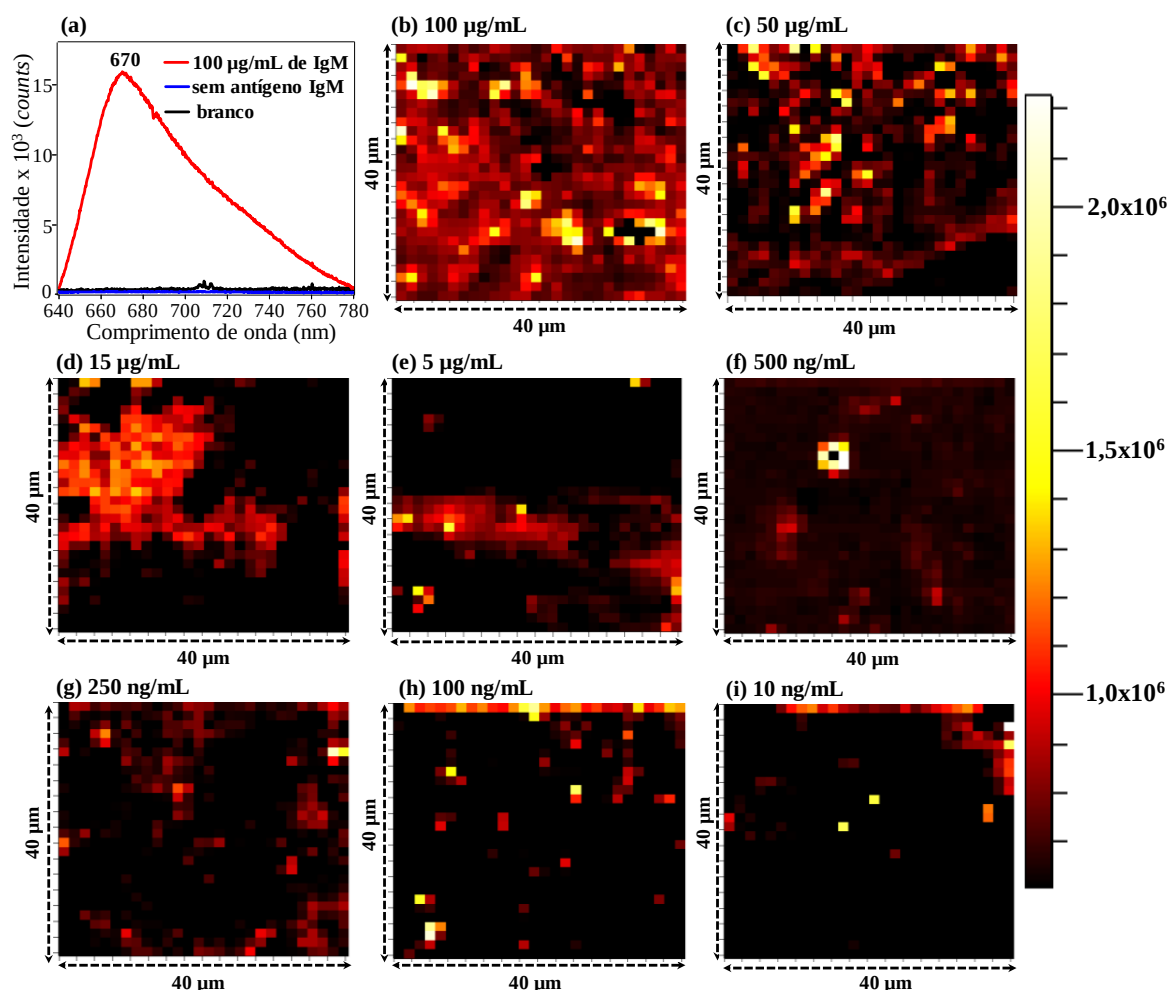


Figura 67: (a) respostas espectrais para um imunoensaio SEF na presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno IgM e para experimentos controle “branco” e “sem antígeno IgM”. (b) – (i) Mapeamentos de área (40 μm x 40 μm com passo de 3 μm) mostrando a distribuição do sinal SEF integrado (área da banda) para diferentes concentrações do antígeno IgM. Linha de laser = 633 nm, potência = 17 mW atenuada para 10%, lente objetiva = 50x e tempo de aquisição = 1s.

A média das respostas SEF para cada região pré-definida mapeada na plataforma de imunoensaio (Figuras 67b – 67i) foi calculada e plotada em função das concentrações de antígeno IgM quantificadas. Uma dependência linear entre a média das intensidades SEF e as concentrações de antígeno IgM foi encontrada para as duas faixas de concentração analisadas ($\mu\text{g/mL}$ e ng/mL), apresentadas nas Figuras 68a e 68b, respectivamente.

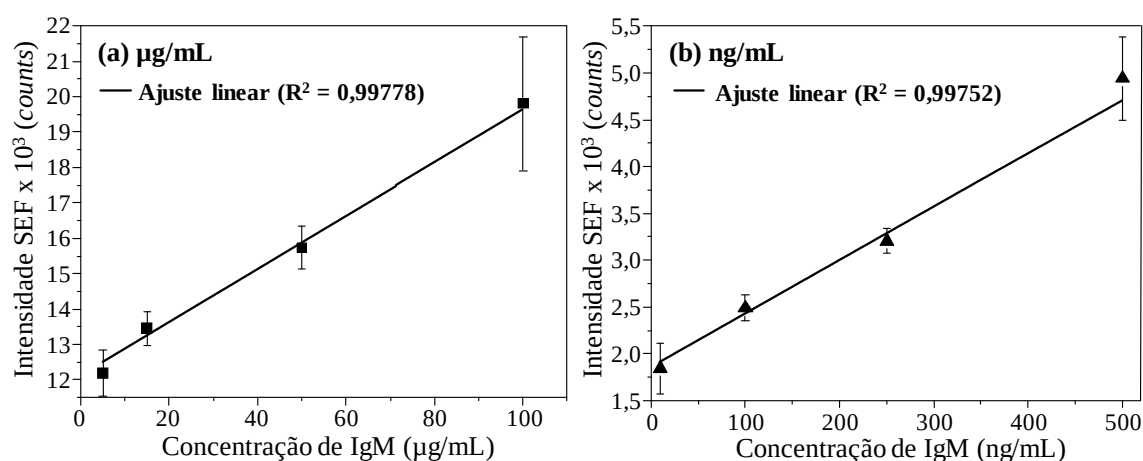


Figura 68: dependência linear entre resposta SEF e concentração de antígeno IgM para as concentrações de (a) 100, 50, 15 e 5 $\mu\text{g/mL}$ e (b) 500, 250, 100 e 10 ng/mL . A resposta da intensidade SEF é uma média dos espectros SEF para cada concentração de antígeno IgM e as barras de erro representam a variação espacial das respostas SEF para cada concentração de antígeno IgM.

Embora os gráficos de calibração, exibidos na Figura 68, sejam lineares para cada intervalo de concentração, a linearidade é perdida quando todos os dados são plotados no mesmo gráfico. Ou seja, o alcance máximo do método está cerca de uma ordem de grandeza dentro de cada faixa de concentração analisada. As barras de erro representam o desvio padrão (SD) da variação espacial do sinal SEF para cada concentração de antígeno IgM quantificada. A variação das barras de erro está distribuída de forma aleatória para as diferentes concentrações de antígeno. Li et al.⁴³ observaram um comportamento semelhante ao analisar a resposta SERS em plataformas de imunoensaio de detecção de antígenos referentes ao câncer.

O limite de detecção (LOD) do nosso sistema de imunoensaio sanduíche SEF foi determinado considerando o nível médio de ruído (~ 500 counts) e o desvio padrão do experimento controle “branco” ($SD_{\text{“branco”}} = \pm 50$ counts). Dessa forma, seria esperado uma intensidade SEF mínima detectável em ~ 650 counts, dentro de um nível de confiança de 95% (média do ruído + $3 \times SD_{\text{“branco”}}$).¹⁸⁸ Uma vez que 10 ng/mL de antígeno IgM foram detectados em ~ 1500 counts (Figura 68b), o LOD pode ser estimado em $\sim 5,0$ ng/mL. As baixas concentrações de antígeno IgM detectadas pelo nosso sistema são compatíveis com os valores relatados na literatura. Em um cenário regular, amostras para teste ELISA são diluídas com tampões para obter concentrações no intervalo de micro – nanogramas. A fim de colocar os resultados da Figura 68 em perspectiva, o LOD encontrado para a detecção de antígenos do vírus da dengue (DENV NS1), por exemplo, é de ca. 75 ng/mL em soro humano.¹¹² Portanto, a plataforma de imunoensaio sanduíche SEF desenvolvida aqui é comparável ao ELISA em termos de custo e complexidade, mas apresenta um melhor desempenho em termos de LOD. Outros métodos de diagnóstico também são bastante aplicados na detecção de antígenos relacionados a doenças como a dengue, como é o caso da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR),¹⁸⁹ porém são mais caros, demorados e complexos.¹⁸⁷

8.2. Imunoensaio utilizando tags de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS tags) para quantificação do vírus da Zika

Como detalhado na seção 3.8.1 dos materiais e métodos, SERS tags foram preparadas a partir de Au-SHINs 100 nm, recobertas com aproximadamente 4 nm de sílica, e então aplicadas na quantificação de antígenos do vírus da Zika. O diagnóstico clínico de infecções por Zika ainda é prejudicado por sintomas não específicos.^{53,190} Além da presença de baixos níveis de antígenos da Zika no sangue humano, os atuais

métodos de diagnóstico enfrentam o desafio da reatividade cruzada dos anticorpos da Zika com outros flavivírus, aumentando os falsos positivos.¹⁹¹ Portanto, são necessários métodos de diagnóstico mais precisos, que aumentem a sensibilidade e evitem a reatividade cruzada, especialmente entre o vírus da Zika e a dengue.

8.2.1. Caracterização morfológica e espectroscópica das Au-SHINs e SERS tags

A composição das Au-SHINs 100 nm com 4 nm de recobrimento de sílica e SERS tags está representada no *cartoon* da Figura 69a bem como seus respectivos espectros de extinção, mostrados na Figura 69b, e suas imagens de MET, exibidas nas Figuras 69c e 69d, respectivamente. As dimensões médias das Au-SHINs e SERS tags foram obtidas pelos histogramas da Figura 70, construídos a partir das imagens de MET.

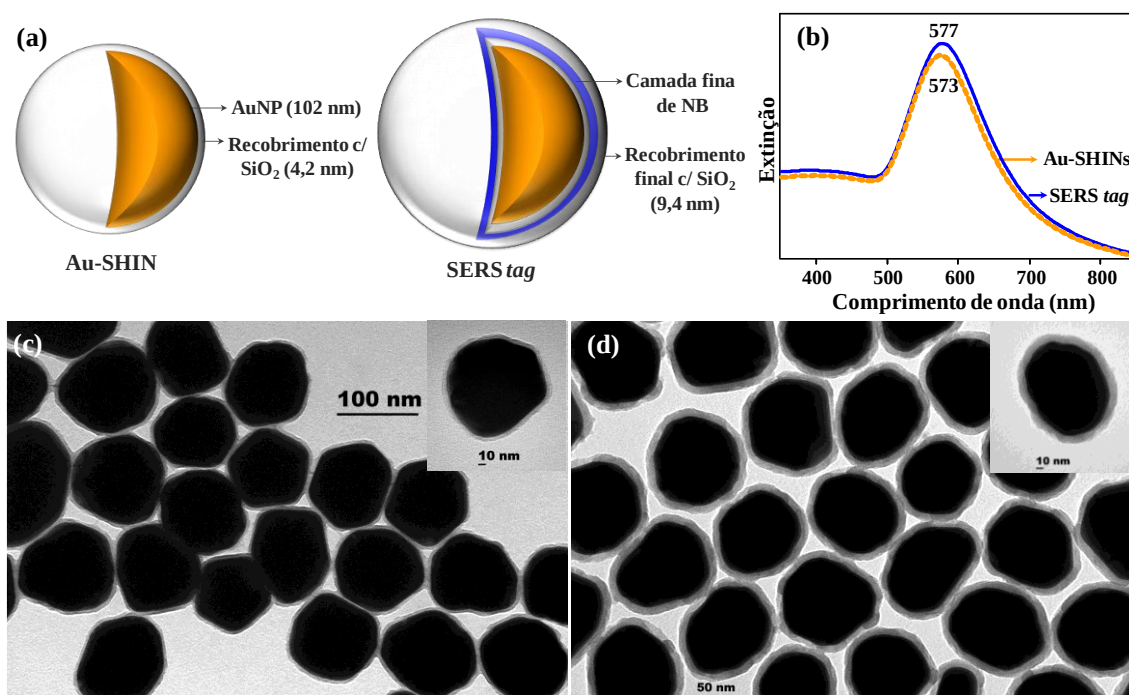


Figura 69: (a) *Cartoon* da composição das Au-SHINs e SERS tags. A Au-SHIN consiste de: AuNPs com $102 \pm 8,0$ nm de diâmetro recobertas com uma espessura de sílica de $4,2 \pm 1,0$ nm; a SERS tag é formada por: Au-SHIN + uma camada ultrafina de azul do Nilo (NB) covalentemente ligada sobre a superfície da Au-SHIN + recobrimento final de sílica com espessura de $9,4 \pm 1,4$ nm, a qual é posteriormente funcionalizada com anticorpos monoclonais da Zika NS1. (b) Espectros de extinção das Au-SHINs e SERS tags com valores máximos de LSPR em 573 e 577, respectivamente. Imagens de MET das (c) Au-SHINs ($102 \pm 8,0$ nm de diâmetro e $4,2 \pm 1,0$ nm de recobrimento com sílica) e (d) SERS tags ($102 \pm 8,0$ nm de diâmetro e $9,4 \pm 1,4$ nm de recobrimento final com sílica).

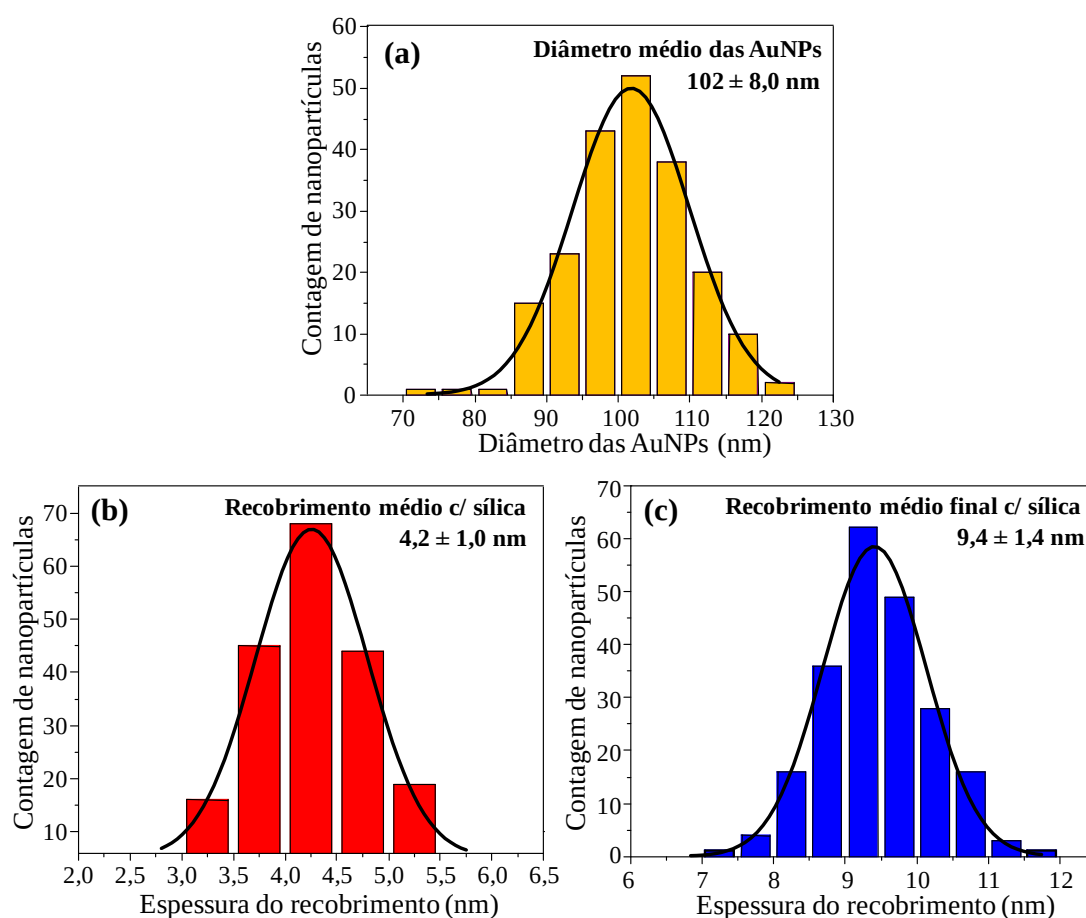


Figura 70: Histogramas para as dimensões médias das Au-SHINs e SERS tags. No caso das Au-SHINs tem-se (a) o diâmetro médio das AuNPs + (b) a espessura do recobrimento com sílica. Já para as SERS tags as dimensões são dadas pelas dimensões das Au-SHINs + (c) a espessura do recobrimento final com sílica. Estes valores foram obtidos a partir das imagens de MET das Figuras 69c e 69d.

Comparando os espectros de extinção, mostrados na Figura 69b, nota-se um pequeno deslocamento no máximo da ressonância de *plasmon* de superfície localizada (LSPR) conforme a espessura do recobrimento com sílica aumenta, das Au-SHINs para as SERS tags, de 573 nm para 577 nm, respectivamente. Em SERS, a distância entre nanopartícula metálica e molécula alvo pode ser otimizada ajustando a espessura do recobrimento com sílica.⁴⁶ Ao aumentar a espessura do recobrimento das nanopartículas plasmônicas, observam-se deslocamentos para o vermelho na LSPR,¹⁰⁻¹² como verificado na Figura 69b.

Através das imagens de MET das Au-SHINs e SERS *tags*, mostradas nas Figuras 69c e 69d, respectivamente, e dos histogramas da Figura 70, obteve-se as dimensões médias das nanopartículas. As Au-SHINs, exibidas na Figura 69c, são formadas por AuNPs com $102 \pm 8,0$ nm de diâmetro (Figura 70a) e recobertas com $4,2 \pm 1,0$ nm de sílica (Figura 70b). Enquanto as SERS *tags*, exibidas na Figura 69d, são compostas pelas Au-SHINs + um recobrimento final com sílica de $9,4 \pm 1,4$ nm de espessura (Figura 70c). Com relação ao recobrimento nas Au-SHINs, vale ressaltar que recobrimentos ultrafinos (espessuras de sílica de 2 – 4 nm)⁴⁶ podem apresentar uma vantagem sobre AuNPs não recobertas, pois além de manterem o efeito do $\vec{E}_{\text{local}}$ sobre as moléculas alvo, evitam a aglomeração das nanopartículas e preparam a superfície das mesmas para uma modificação futura, tal como a funcionalização.¹⁵³

A validação do recobrimento com sílica na amplificação do espalhamento Raman foi realizada através de experimentos com solução de NB + AuNPs 100 nm e solução de NB + Au-SHINs 100 nm com 4 nm de recobrimento. Em ambos os casos a concentração final de NB foi de 10^{-6} mol/L. Os detalhes experimentais estão descritos na seção 3.8.1 dos materiais e métodos e os resultados mostrados na Figura 71. Em ambos os casos (Figura 71), ocorre supressão de emissão da fluorescência e os espectros SERRS do NB são obtidos. As duas bandas de maior amplificação são observadas em 593 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento do anel fenoxazina^{175,176} e a deformações no anel do tipo C-C-C e C-N-C no plano,¹⁹² respectivamente. Uma estimativa do EF pode ser feita considerando a razão das intensidades referente a banda em 593 cm^{-1} nos espectros SERRS e Raman ressonante (SERRS/RR). Os valores de EFs encontrados foram de $4,5 \times 10^3$ para as AuNPs + solução de NB e 2×10^3 para as Au-SHINs + solução de NB. Para uma molécula localizada na superfície das AuNPs ou muito próxima a elas, a amplificação do espalhamento Raman é basicamente produzida

pela amplificação do $\vec{E}_{\text{local}}$,¹⁹³ que é proporcional a E^4 .^{3,78} Portanto, os EFs obtidos nestes experimentos são comparáveis com os observados na literatura,^{89,194} estando de acordo com o previsto pelo mecanismo eletromagnético.^{4,180}

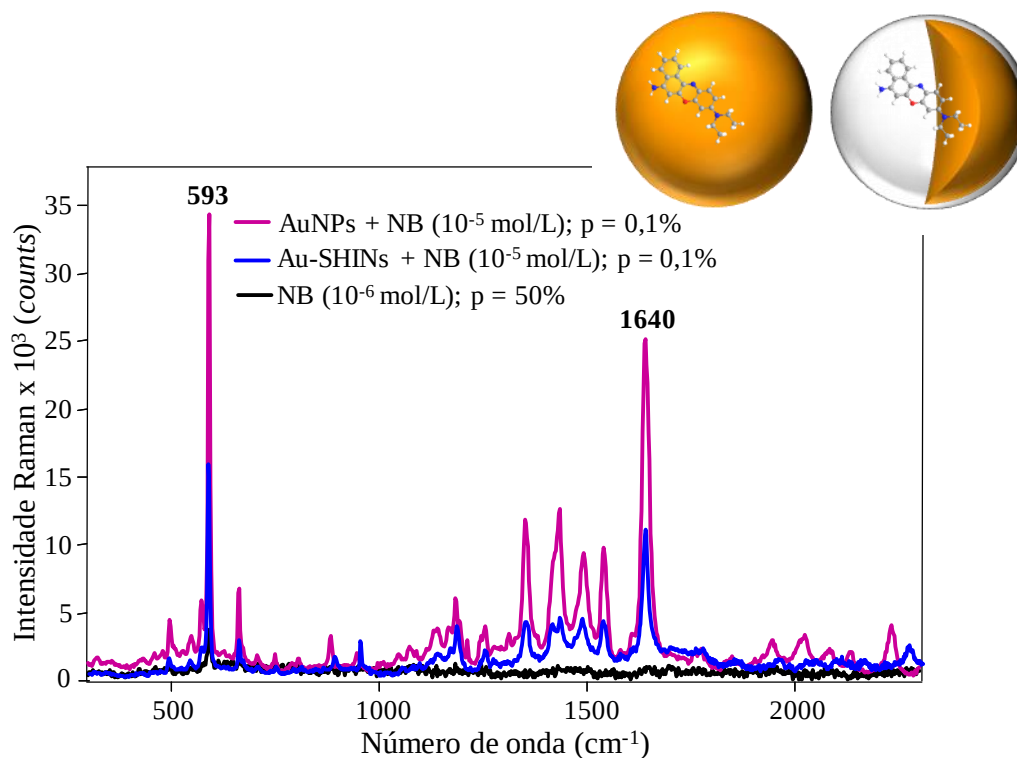


Figura 71: validação do recobrimento com sílica na amplificação do espalhamento Raman. Espectro Raman ressonante (RR) da solução de NB com concentração de 10^{-6} mol/L (linha preta) e espectros SERRS das soluções de NB contendo AuNPs (linha roxa) e Au-SHINs (linha azul), com concentrações finais de NB de 10^{-6} mol/L. Linha de laser de excitação em 633 nm. Nos *insets* tem-se representado (da esquerda para a direita): solução de NB + AuNPs e solução de NB + Au-SHINs.

A Figura 72 exibe o espectro Raman ressonante da solução de NB (10^{-4} mol/L) e os espectros SERRS das soluções de NB contendo AuNPs e Au-SHINs, com concentrações finais de NB de 10^{-6} mol/L. Os espectros SERRS das SERS tags e das SERS tags na presença de 50 $\mu\text{g/mL}$ do antígeno da Zika (Ab-Zika-SERS tags), com a configuração da plataforma de imunoenensaio sanduíche proposta na seção 3.8 dos materiais e métodos, estão presentes na Figura 72. Os experimentos referentes a estes

resultados foram realizados a partir da adição de volumes conhecidos de cada solução ou suspensão coloidal sobre substrato, secagem e então realização das medidas.

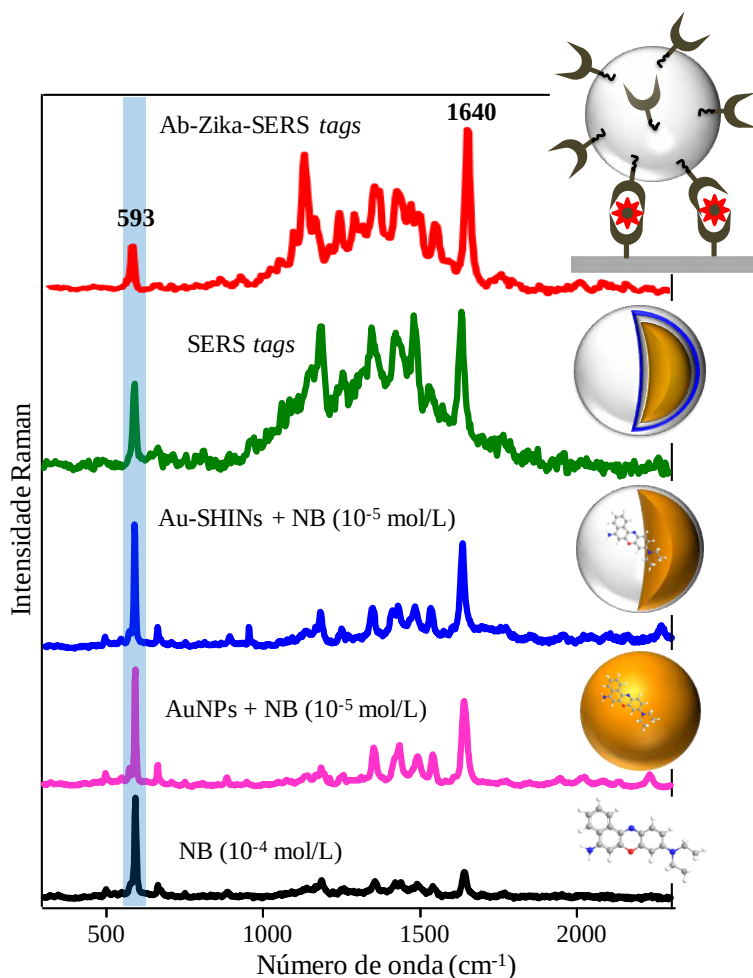


Figura 72: espectro Raman ressonante da solução de NB 10^{-4} mol/L (linha preta) e espectros SERRS das soluções de NB contendo AuNPs (linha rosa) e Au-SHINs (linha azul), com concentrações finais de NB de 10^{-6} mol/L, e das SERS tags (linha verde) e Ab-Zika-SERS tags (linha vermelha). Linha de laser de excitação em 633 nm.

A semelhança entre os espectros SERRS do NB obtidos em AuNPs e Au-SHINs, Figura 72, confirma que o recobrimento ultrafino com sílica (~ 4 nm de espessura) não afeta as características espectrais SERRS da molécula de NB. A comparação entre os espectros SERRS das Au-SHINs e SERS tags (Figura 72), indica que a impressão digital Raman do NB não é afetada significativamente pelas modificações químicas usadas na fabricação das SERS tags. Dessa forma, as pequenas variações no perfil espectral das SERS tags quando comparada aos controles (solução de NB, solução de

NB + AuNPs e solução de NB + Au-SHINs) confirmam que as camadas de sílica, em torno das moléculas de NB, não alteraram significativamente a estrutura química do NB. Além disso, os espectros das SERS *tags* não são afetadas quando na presença de 50 µg/mL do antígeno da Zika (Ab-Zika-SERS *tags*).

Ambos os espectros SERRS, das SERS *tags* e das Ab-Zika-SERS *tags*, possuem perfil espectral semelhante ao do Raman ressonante da solução de NB (Figura 72), a menos de pequenas variações. Por exemplo, as intensidades relativas entre a banda em 593 cm⁻¹, atribuída ao estiramento do anel fenoxazina,¹⁷⁶ e a banda em 1640 cm⁻¹, atribuída a deformações no anel do tipo C-C-C e C-N-C no plano,¹⁹² diminui nas SERS *tags* e nas Ab-Zika-SERS *tags*, o que associada às regras de seleção de superfície para o efeito SERS,^{3,4} pode indicar uma orientação preferencial das moléculas de NB nas SERS *tags* e, conseqüentemente, nas Ab-Zika-SERS *tags* (como observado na Figura 72). Considerando que a amplificação do sinal Raman é altamente dependente da orientação molecular, onde modos vibracionais com dipolos paralelos ao $\vec{E}_{\text{local}}$ irão resultar em máximas amplificações, enquanto modos vibracionais com dipolos perpendiculares ao $\vec{E}_{\text{local}}$ resultarão em amplificações de menores intensidades,^{3,4} pode-se assumir que as moléculas de NB estão adsorvidas verticalmente sobre a superfície das Au-SHINs, com o dipolo do anel fenoxazina paralelo ao $\vec{E}_{\text{local}}$, resultando em máxima amplificação da banda em 593 cm⁻¹. Por outro lado, as moléculas de NB estão adsorvidas dentro das SERS *tags* em uma orientação molecular não vertical, mais inclinada a horizontal em relação à superfície das Au-SHINs, resultando na diminuição de intensidade da banda em 593 cm⁻¹ em relação à banda em 1640 cm⁻¹. Outra possível explicação para a variação nas intensidades relativas entre as bandas em 593 cm⁻¹ e 1640 cm⁻¹ (Figura 72) está relacionada à formação do precursor de sílica-NB nas SERS *tags*. Os grupos isotiocianatos do isocianato de 3-(triethoxysilil) propilo podem unir-se

covalentemente aos grupos amino terminais do NB. A formação deste novo composto (precursor de sílica-NB) pode ser responsável pelas pequenas modificações no perfil espectral das SERS *tags*.

8.2.2. Aplicação das SERS *tags* na quantificação do antígeno da Zika

A plataforma de imunoensaio SERS foi aplicada na quantificação do antígeno da Zika usando a configuração sanduíche descrita na seção 3.8 dos materiais e métodos. Os substratos modificados com anticorpos da Zika foram incubados em soluções do antígeno da Zika NS1 com concentrações variando de 50 µg/mL a 10 ng/mL, seguidos da adição das SERS *tags*.

Primeiramente, experimentos controle foram realizados e comparados ao espectro SERRS das SERS *tags* na presença de 50 µg/mL do antígeno da Zika com a configuração sanduíche da plataforma de imunoensaio SERS (Ab-Zika-SERS *tags*) (Figura 73a). Os experimentos controle envolvidos foram: (i) “branco” (substratos modificados com anticorpos da Zika incubados em tampão PBS sem antígenos da Zika NS1 e sem SERS *tags*); e (ii) “sem antígeno Zika” (substratos modificados com anticorpos da Zika e incubados com SERS *tags* em tampão PBS sem prévia incubação com solução de antígenos da Zika NS1). A detecção das diferentes concentrações de antígeno na plataforma de imunoensaio foi realizada através de mapeamentos SERRS mostrados nas Figuras 73c-73k. Espectros SERRS coletados ponto-a-ponto ao longo de uma área de 40 µm x 40 µm com passo de 3 µm foram registrados para cada concentração do antígeno da Zika, resultando em um total de 784 espectros para cada concentração. Note que o número de dados pode ser aumentado diminuindo os passos nos mapeamentos. No entanto, o tempo dos testes de imunoensaio aumentaria. Dessa forma, deve-se estabelecer um compromisso entre o tempo de imunoensaio e as estatísticas apropriadas. Apesar dos 784 espectros coletados, o tempo de aquisição de

cada mapeamento é de cerca de 20 a 25 minutos, o que não dificulta o diagnóstico da doença em um ambiente de cuidados de saúde primário.

A intensidade da banda em 593 cm^{-1} foi plotada ao longo dos mapeamentos de área, onde regiões mais claras referem-se a maiores intensidades dessa banda (Figuras 73c-73k). Complementarmente aos mapeamentos de área, mostrados nas Figuras 73c-73k, as médias das intensidades do pico em 593 cm^{-1} para cada mapeamento SERRS foram calculadas (a partir de um total de 784 espectros obtidos para cada concentração do antígeno da Zika e usados sem nenhum tratamento matemático prévio) e uma curva de calibração foi construída (Figura 73b).

A distribuição das intensidades da banda em 593 cm^{-1} nos mapeamentos de área SERRS (Figuras 73c-73k) indicam que as SERS *tags* estão bem dispersas ao longo da superfície da plataforma de imunoensaio. Os antígenos da Zika NS1 podem ser detectados em cada concentração avaliada. A banda destacada em 593 cm^{-1} foi escolhida para analisar as respostas SERRS nos mapeamentos, uma vez que não é coincidente com nenhum background dos experimentos controle (“branco” e “sem antígeno Zika”), garantindo que o sinal observado é decorrente apenas das Ab-Zika-SERS *tags* (Figura 73a). Com relação a curva de calibração (semi-log, Figura 73b) da resposta SERRS (média das intensidades do pico em 593 cm^{-1} para cada concentração de antígeno analisada) em função da concentração de antígeno da Zika, de $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ a 10 ng/mL , uma linearidade foi observada com coeficiente de determinação $R^2 = 0,98762$.

Destaca-se que a menor concentração de antígeno da Zika NS1 detectada aqui (10 ng/mL), embora não tenha sido obtida a partir de matrizes biológicas, está pelo menos quatro ordens de magnitude abaixo de imunoensaios enzimáticos do tipo ELISA ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) projetados para diagnóstico clínico de Dengue e Zika em soro

humano.^{33,47,186,195} Além disso, o limite de detecção (LOD) da plataforma de imunoenensaio SERS, calculado a partir do desvio padrão da resposta "branco" (SD_{branco}) e da inclinação (b) da curva de calibração (Figura 73b),¹⁹⁶ alcançou um valor próximo ao da menor concentração de antígeno da Zika NS1 detectada (12,5 ng/mL) e é menor do que os valores encontrados para detecção de antígenos NS1 (Dengue e Zika). Por exemplo, o LOD para Dengue NS1 em sistema de imunoenensaio sanduíche baseado em tiras de fluxo lateral é de 75 ng/mL.¹¹² Portanto, a maior sensibilidade do nosso sistema pode fornecer uma janela significativa para o diagnóstico precoce de Zika. Além disso, o aperfeiçoamento no LOD só é possível graças à amplificação do sinal Raman ressonante do NB ($EF \sim 10^3$) ativado pelas SERS tags, destacando o potencial dessa plataforma de imunoenensaio no aumento da sensibilidade nos métodos de diagnóstico de doenças febris agudas (AFIs). Em comparação com outros sensores, como corantes fluorescentes ou pontos quânticos (do inglês, *quantum dots* QDs), as SERS tags exibem propriedades fotofísicas mais vantajosas para aplicações em imunoenensaio, as quais incluem maior sensibilidade, maior fotoestabilidade e quantificação mais fácil.^{197–199}

A reatividade cruzada, freqüentemente encontrada no diagnóstico da Zika,^{47,200,201} foi avaliada com 50 µg/mL do antígeno da Dengue NS1 (Figura 73k). As concentrações de antígeno da Zika e da Dengue nas Figuras 73c e 73k são os mesmos, sendo que o mapeamento SERRS do antígeno da Dengue NS1 (Figura 73k) exibiu as intensidades mais baixas entre os mapeamentos da Figura 73, mostrando a especificidade da nossa plataforma de imunoenensaio para antígenos da Zika NS1. A especificidade de imunoenensaio sanduíches baseados no efeito SERS também foi explorada por Sánchez-Purra et al.²⁰² para detecção múltipla de antígenos da Zika e da Dengue utilizando anticorpos específicos para cada doença. No nosso caso, o mesmo anticorpo (Zika-mAb) foi testado frente aos dois distintos antígenos: Zika NS1 e Dengue NS1, o que

não foi uma limitação para distinção das doenças, reforçando a especificidade observada por Sánchez-Purra et al.²⁰²

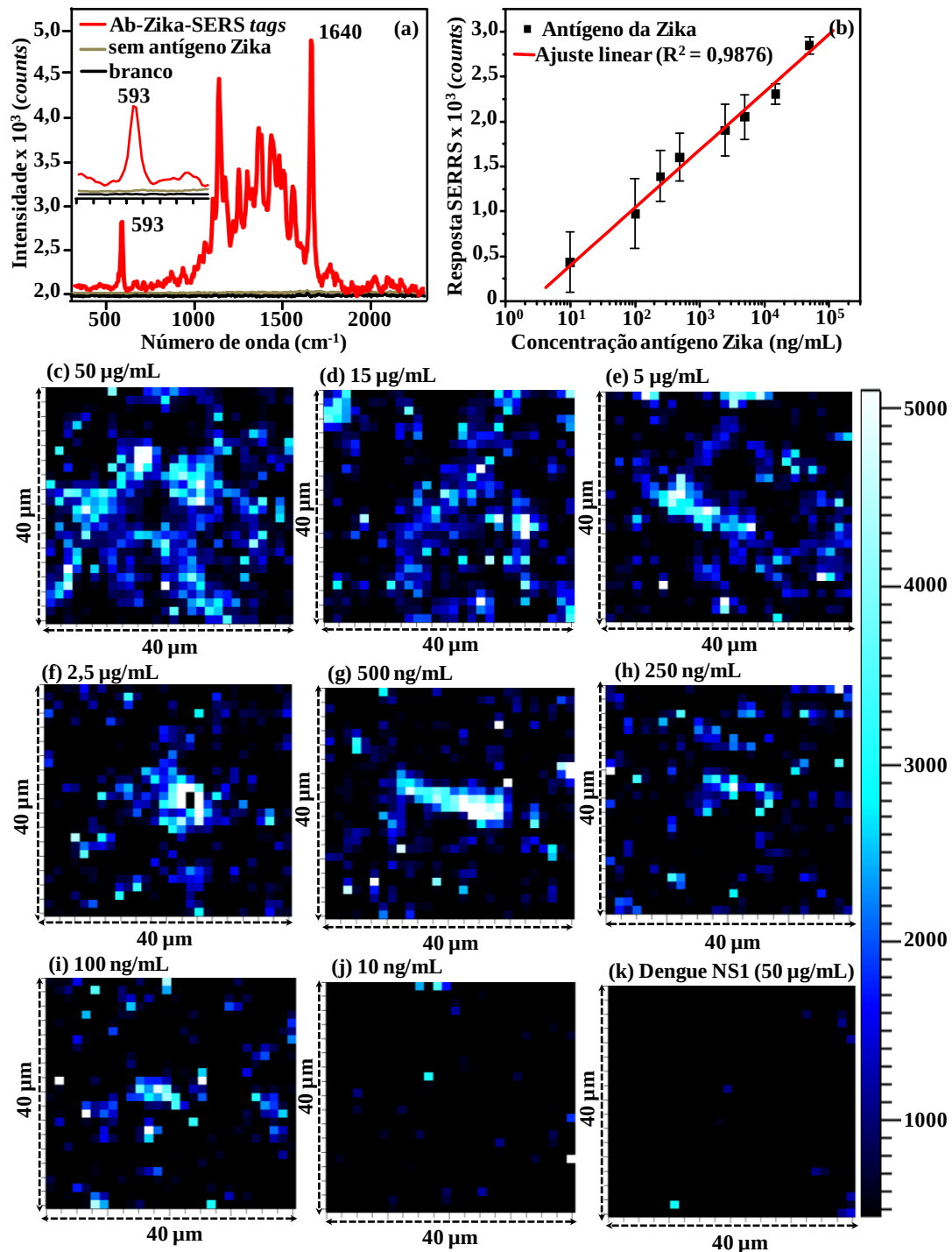


Figura 73: espectros Raman dos experimentos controle “branco” e “sem antígeno Zika” e SERS das Ab-Zika-SERS tags. (b) Dependência linear da resposta SERS (médias das intensidades em 593 cm⁻¹ sem tratamento matemático prévio) pela concentração de antígeno da Zika, de 50 μg/mL a 10 ng/mL, e barras de erro representando os desvios padrão. Mapeamentos de área SERS (40 μm x 40 μm, passo de 3 μm) mostrando a distribuição de intensidade em 593 cm⁻¹ para (c) – (l) diferentes concentrações do antígeno da Zika NS1 e (k) antígeno da Dengue NS1 (50 μg/mL). Laser em 633 nm.

A fim de confirmar a habilidade de distinção da nossa plataforma de imunoensaio SERRS quando diferentes concentrações de antígeno da Zika são comparados entre si e com uma concentração específica de antígeno da Dengue, recorremos a métodos estatísticos para análise dos dados. Essa habilidade de distinção foi confirmada tratando os mapeamentos SERRS (Figura 73) com a técnica de projeção multidimensional IDMAP, cujos resultados estão na Figura 74. Basicamente, cada círculo no gráfico representa uma média das intensidades da banda em 593 cm^{-1} dentre os mapeamentos SERRS de cada concentração de antígeno. Quanto mais próximos os círculos, mais similar as respostas dos mapeamentos SERRS.

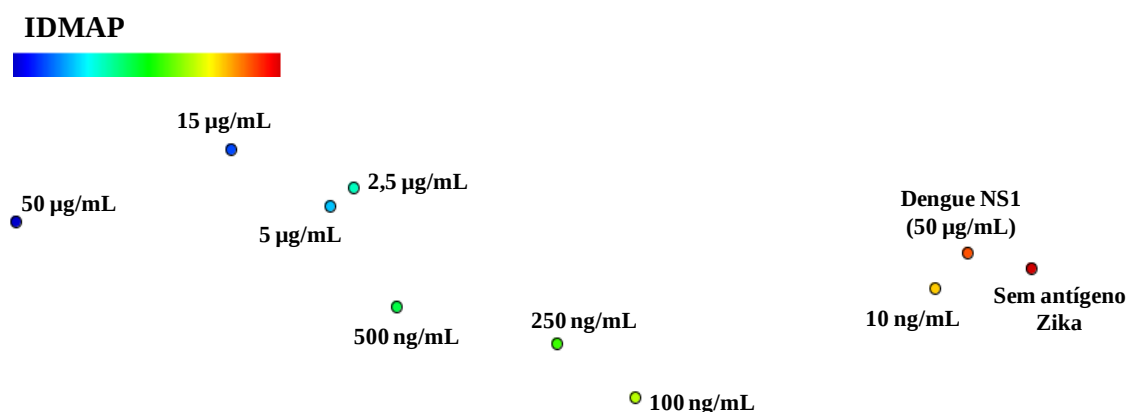


Figura 74: projeção multidimensional IDMAP para diferentes concentrações de antígeno da Zika, para uma concentração específica de antígeno da Dengue NS1 (50 µg/mL) e para nenhuma concentração de antígeno da Zika (“sem antígeno Zika”). Cada círculo representa uma média das intensidades da banda em 593 cm^{-1} dentre os mapeamentos SERRS de cada concentração. Quanto mais próximos os círculos, mais similar a resposta dos mapeamentos SERRS.

As diferentes concentrações de antígenos da Zika são agrupadas a parte umas das outras, seguindo um padrão de crescimento da concentração (da direita para a esquerda). Observa-se que a concentração específica de antígeno da Dengue NS1 (50 µg/mL) é muito distinta das concentrações de antígeno da Zika, com exceção da 10 ng/mL). Além disso, está próxima do experimento controle (“sem antígeno Zika”), o que confirma a especificidade da nossa plataforma de imunoensaio em relação aos

antígenos da Zika NS1. Portanto, a plataforma de imunoensaio SERS desenvolvida aqui é capaz de detectar diferentes concentrações de antígeno da Zika livre de reatividade cruzada com antígenos da Dengue NS1 na faixa de concentração de 50 µg/mL a 100 ng/mL.

Capítulo 9

9. Conclusões e considerações finais

9.1. Conclusões

A protoporfirina (IX) dimetil éster de zinco(II) (ZnPPIX-DME) foi aplicada com sucesso na fabricação e caracterização de filmes nanoestruturados através das técnicas de Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS), formando arranjos supramoleculares. As moléculas de ZnPPIX-DME apresentam-se arranjadas na interface ar/água ultrapura com os grupos ésteres tocando a subfase aquosa, favorecendo a formação de filmes de Langmuir estreitamente empacotados pela forte interação π - π de empilhamento. O crescimento dos filmes LB e LS em substratos sólidos foi controlado, com uma quantidade equivalente de moléculas de ZnPPIX-DME por monocamada depositada. A espessura da monocamada para ambos os filmes, LB e LS, é coincidente com a altura das moléculas de ZnPPIX-DME, as quais são homoganeamente distribuídas ao longo dos filmes e isotropicamente dispostas em termos de organização molecular. Portanto, os métodos aplicados aqui podem ser estendidos para outros materiais organometálicos a fim de produzir arranjos supramoleculares sob a forma de filmes nanoestruturados.

A incorporação de nanopartículas de ouro (AuNPs) em filmes de metaloporfirina se deu através de uma estratégia baseada em filmes LB codepositados, a fim de obter o espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS). A partir de alterações observadas nas propriedades dos filmes de Langmuir pôde ser inferido que as AuNPs, adicionadas na subfase, interagem com as moléculas de ZnPPIX-DME. As isothermas π -A foram deslocadas para maiores valores de áreas moleculares como resultado da interação entre as AuNPs e as moléculas de ZnPPIX-DME. As interações físicas são os fatores-chave, permitindo a codeposição dos filmes LB contendo ambas, AuNPs e

ZnPPIX-DME. O sinal SERS da ZnPPIX-DME é observado com amplificação de cerca de 10^3 e sugerem que as moléculas de ZnPPIX-DME são adsorvidas fisicamente sobre as AuNPs através de ambos, grupos ésteres e esqueleto molecular. Uma vez que a distribuição das AuNPs não é homogênea, os espectros SERS seguem a distribuição espacial das AuNPs, evidenciando que maiores fatores de amplificação são encontrados em agregados de AuNPs. Portanto, a estratégia aplicada aqui é uma contribuição para os métodos SERS pela simplicidade e capacidade de lidar com moléculas que podem ser arranjadas na forma de filmes LB.

Nanopartículas de ouro recobertas com sílica (Au-SHINs) contendo tamanhos de núcleo distintos (40 e 100 nm) e mesma espessura de recobrimento com sílica (10 nm) foram incorporadas a distintos sistemas (monocamadas LB e solução aquosa) visando o efeito de amplificação de sinal SEF. Um aumento na intensidade de emissão do sinal SEF foi alcançado com Au-SHINs com diâmetro de 100 nm, em solução e em filmes LB. Os fatores de amplificação (EF) são ainda maiores para as Au-SHINs agregadas com NaCl em solução de CV, e os resultados são consistentes por cálculos computacionais de FDTD. O fator de amplificação do sinal SEF, alcançado com as Au-SHINs 100 nm espalhadas sobre a monocamada LB de EOSDEC (EF = 110), aumenta dramaticamente a baixas temperaturas (EF = 170), contornando o efeito de aquecimento local criado pela excitação plasmônica das nanopartículas metálicas. Maiores EFs são obtidos quando há um maior acoplamento do *plasmon* de extinção e da emissão de fluorescência. No caso das Au-SHINs 100 nm um importante fator de contribuição é que o aumento do espalhamento da nanopartícula está diretamente relacionado com o aumento do tamanho do núcleo da nanopartícula.

AuNPs 100 nm e Au-SHINs 100 nm recobertas com 4 nm de sílica foram utilizadas na detecção do herbicida ametrina (AMT) em solução etanólica e em cana de

açúcar via efeito SERS. O herbicida foi detectado em solução a uma concentração de 10^{-5} mol/L utilizando ambas nanopartículas, sendo possível sugerir a forma como as moléculas de AMT estão adsorvidas sobre a superfície das AuNPs e Au-SHINs (paralelas via anéis triazínicos). Já no caso da detecção em cana de açúcar, o *background* de fluorescência associado a camada de sílica das Au-SHINs dificultou a detecção de concentrações abaixo de 10^{-3} mol/L. As demais concentrações (10^{-4} a 10^{-8} mol/L) foram detectadas apenas com as AuNPs 100 nm. Vale ressaltar que a faixa de concentração analisada permitiu alcançar o limite máximo de resíduos (MRLs) de AMT regulamentado para produtos agrícolas: 0,05 mg/kg equivalente a concentração de $5,3 \times 10^{-8}$ mol/L de AMT em cana de açúcar, até então a mais baixa concentração detectada.

Tags de fluorescência amplificada em superfície (SEF *tags*) foram fabricadas com sucesso usando o conceito de nanopartículas recobertas com sílica (Au-SHINs). Ajustando o tamanho do núcleo (AuNPs 100 nm) e da espessura do recobrimento com sílica (10 nm) foi possível otimizar a amplificação da fluorescência da camada de azul do Nilo (NB) quimicamente ligado a sílica. As nanoestruturas foram subsequentemente envolvidas em uma segunda camada de sílica (~ 5 nm de espessura), funcionalizadas com anticorpos IgM e aplicadas na plataforma de imunensaio SEF para detecção de antígenos IgM. Soluções do antígeno IgM, até 10 ng/mL, foram detectadas dentro de uma dependência linear entre a intensidade média de fluorescência e as concentrações de antígeno. O limite de detecção (LOD $\sim 5,0$ ng/mL) aqui alcançado é pelo menos 1 ordem de magnitude menor do que os ensaios similares já disponíveis para o diagnóstico de doenças infecciosas, destacando o potencial dos fenômenos de superfície para aplicações imunológicas. Similar plataforma de imunensaio, utilizando *tags* de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS *tags*), foi preparada e aplicada com sucesso na detecção de baixas concentrações do antígeno do vírus da Zika. Neste

caso, o efeito SERS só foi possível graças à amplificação do sinal Raman ressonante ($EF \sim 10^3$) proveniente das moléculas de NB ligadas às Au-SHINs recobertas com uma camada ultrafina de sílica (AuNPs: 102 ± 8 nm e espessura de recobrimento com sílica: $4,2 \pm 1,0$ nm). Os anticorpos da Zika ligados a uma camada final de sílica ($9,4 \pm 1,4$ nm) em torno das SERS tags forneceram especificidade ao sistema em relação aos antígenos da Zika, o que foi fundamental para diminuir a reatividade cruzada com os antígenos da dengue e evitar falsos positivos. Essas experiências destacam o potencial das SERS tags em testes clínicos de diagnóstico.

9.2. Considerações finais

Essa tese contém resultados a partir das atividades executadas no período de julho/2013 a dezembro/2017, referentes ao projeto de doutorado financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP processo nº 2013/01897-4. No período de 01/07/2015 a 30/06/16 realizei um estágio de doutorado no exterior (BEPE 2015/03143-2) junto ao Departamento de Química da Universidade de Victoria, Canadá, sob a orientação do professor Dr. Alexandre G. Brolo, onde tive a oportunidade de trabalhar no desenvolvimento e aplicação de marcadores SEF e SERS para detecção dos antígenos IgM e do vírus da Zika via plataformas de imunoensaio.

Esta tese ainda contou com a coorientação da professora Dra. Ana Maria Pires do Departamento de Química da FCT - Unesp/ Presidente Prudente, que atua na área de síntese de compostos de coordenação envolvendo metais de transição e/ou terras raras e no processo de fluorescência destes complexos, e com a colaboração do professor Dr. Ricardo F. Aroca, professor emérito da Universidade de Windsor/Canadá, reconhecido pela comunidade internacional como um dos maiores especialistas em espalhamento Raman, SERS e SEF. Os resultados obtidos ao longo do doutorado propiciaram a participação em congressos nacionais e internacionais, além da publicação de trabalhos

científicos em revistas especializadas. Abaixo é apresentada a produção científica durante o período descrito, a qual contempla também trabalhos em colaboração com outros pesquisadores, mas que não compõem a tese de doutorado:

Artigos:

1. Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Assis, F. F.; Pires, A. M.; Oliveira, K. T.; Constantino, C. J. L. Supramolecular arrangements of an organometallic forming nanostructured films. *Materials Research* **2014**, 17(6), 1375-1383.
2. Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Constantino, C. J. L.; Pires, A. M. Sprayed films of europium complexes toward light conversion devices. *Journal of Luminescence* **2014**, 153, 272-280.
3. Rubira, R. J. G.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Maximino, M. D.; Aléssio, P.; Martin, C. S.; Oliveira Jr., O. N.; Fatore, F. M.; Paulovich, F. V.; Constantino, C. J. L. Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization. *Colloid and Polymer Science* **2014**, 292, 2811-2820.
4. Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Assis, F. F.; Pires, A. M.; Oliveira, K. T.; Aroca, R. F.; Constantino, C. J. L. Co-Deposition of gold nanoparticles and metalloporphyrin using the Langmuir–Blodgett (LB) technique for Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Applied Spectroscopy* **2015**, 69(4), 451-456.
5. Rubira, R. J. G.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Paulovich, F. V.; Oliveira Jr., O. N.; Constantino, C. J. L. Probing trace levels of prometryn solutions: from test samples in the lab toward real samples with tap water. *Journal Materials Science* **2016**, 51, 3182-3190.

6. Souza, A. E.; Sasaki, G. S.; Camacho, S. A.; Teixeira, S. R.; Li, M. S.; Longo, E. Defects or charge transfer: Different possibilities to explain the photoluminescence in crystalline $\text{Ba}(\text{Zr}_x\text{Ti}_{1-x})\text{O}_3$. *Journal of Luminescence* **2016**, 179, 132–138.
7. Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Albella, P.; Oliveira Jr., O. N.; Constantino, C. J. L.; Aroca, R. F. Increasing the enhancement factor in Plasmon-Enhanced Fluorescence with shell-isolated nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2016**, 120, 20530–20535.
8. Camacho, S. A.; Sobral-Filho, R. G.; Aoki, P. H. B.; Constantino, C. J. L.; Brolo, A. G. Immunoassay quantification using surface-enhanced fluorescence (SEF) tags. *Analyst* **2017**, 142, 2717–2724.
9. Ozório, M. S.; Camacho, S. A.; Cordeiro, N. J. A.; Duarte, L.; Alves, N. Solvent Effect on Morphology and Optical Properties of Poly(3-hexylthiophene):TIPS-Pentacene Blends. *Journal of Electronic Materials* **2017**, doi: 10.1007/s11664-017-5931-9.

Capítulos em livros

1. Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Oliveira Jr., O. N.; Constantino, C. J. L.; Aroca, R. F. Plasmon enhanced luminescence with shell-isolated nanoparticles. Surface Plasmon Enhanced, Coupled and Controlled Fluorescence. **2017**, 16, 257-270.

Referências

1. Klauk, H. *Organic Electronics: Materials, Manufacturing and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (2006).
2. Pron, A., Gawrys, P., Zagorska, M., Djurado, D. & Demadrille, R. Electroactive materials for organic electronics: preparation strategies, structural aspects and characterization techniques. *Chem Soc Rev* **39**, 2577–2632 (2010).
3. Moskovits, M. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783–826 (1985).
4. Aroca, R. F. *Surface-enhanced vibrational spectroscopy*. (2006).
5. Kneipp, K. *et al.* Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* **78**, 1667–1670 (1997).
6. Constantino, C. J. L., Lemma, T., Antunes, P. A. & Aroca, R. Single-molecule detection using surface-enhanced resonance Raman scattering and Langmuir-Blodgett monolayers. *Anal. Chem.* **73**, 3674–3678 (2001).
7. Li, J. F. *et al.* Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nature* **464**, 392–395 (2010).
8. Guerrero, A. R. & Aroca, R. F. Surface-Enhanced Fluorescence with Shell-Isolated Nanoparticles (SHINEF). *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 665–668 (2011).
9. Procházka, M., Hajduková, N. & Stěpánek, J. Surface-enhanced resonance Raman scattering of porphyrins on gold nanoparticles attached to silanized glass plates. *Biopolymers* **82**, 390–393 (2006).
10. Aroca, R. F. *et al.* Plasmon-Enhanced Fluorescence and Spectral Modification in SHINEF. *J. Phys. Chem. C* **115**, 20419–20424 (2011).
11. Guerrero, A. R., Zhang, Y. & Aroca, R. F. Experimental Confirmation of Local Field Enhancement Determining Far-Field Measurements with Shell-Isolated Silver Nanoparticles. *Small* **8**, 2964–2967 (2012).
12. Osorio-Roman, I. O., Guerrero, A. R., Albella, P. & Aroca, R. F. Plasmon Enhanced Fluorescence with Aggregated Shell-Isolated Nanoparticles. *Anal. Chem.* **86**, 10246–10251 (2014).
13. Smith, W. E. Practical understanding and use of surface enhanced Raman scattering/surface enhanced resonance Raman scattering in chemical and biological analysis. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 955 (2008).
14. Li, D.-W., Zhai, W.-L., Li, Y.-T. & Long, Y.-T. Recent progress in surface enhanced Raman spectroscopy for the detection of environmental pollutants. *Microchim. Acta* **181**, 23–43 (2014).
15. Halvorson, R. A. & Vikesland, P. J. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for environmental analyses. *Environmental Science and Technology* **44**, 7749–7755 (2010).
16. Santos Costa, J. C. *et al.* High performance gold nanorods and silver nanocubes in surface-enhanced Raman spectroscopy of pesticides. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 7491 (2009).
17. Jiang, L., Huang, J., Liang, L., Peng, Y. Z. & Yang, H. Mobility of prometryne in soil as affected by dissolved organic matter. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 11933–11940 (2008).
18. Chen, Y., Chen, Z.-P., Jin, J.-W. & Yu, R.-Q. Quantitative determination of ametryn in river water using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with an advanced chemometric model. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **142**, 166–171 (2015).
19. Fang, H. *et al.* Ultrasensitive and quantitative detection of paraquat on fruits

- skins via surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sensors Actuators, B Chem.* **213**, 452–456 (2015).
20. Rubira, R. J. G. *et al.* Probing trace levels of prometryn solutions: from test samples in the lab toward real samples with tap water. *J. Mater. Sci.* **51**, 3182–3190 (2016).
 21. Silva, K. S., Freitas, F. C. L., Braga, D. F., Dombroski, J. L. D. & Santos, A. F. B. Ametryn Leaching in Soils from the Sugarcane Region in Northeastern Brazilian. *Planta Daninha* **34**, 839–848 (2016).
 22. Weber, J. B., Best, J. A. & Gonese, J. U. *Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil. Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil sssaspecia*, (1993).
 23. Aktar, W., Sengupta, D. & Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* **2**, 1–12 (2009).
 24. Jacomini, A. E., de Camargo, P. B., Avelar, W. E. P. & Bonato, P. S. Determination of Ametryn in River Water, River Sediment and Bivalve Mussels by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* **20**, 107–116 (2009).
 25. Kim, K.-H., Kabir, E. & Jahan, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* **11** (2016).
 26. ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. (2017).
 27. Camacho, S. A., Sobral-Filho, R. G., Aoki, P. H. B., Constantino, C. J. L. & Brolo, A. G. Immunoassay quantification using surface-enhanced fluorescence (SEF) tags. *Analyst* **142**, 2717–2724 (2017).
 28. Bodenreider, C. *et al.* A fluorescence quenching assay to discriminate between specific and nonspecific inhibitors of dengue virus protease. *Anal. Biochem.* **395**, 195–204 (2009).
 29. Lee, M., Lee, K., Kim, K. H., Oh, K. W. & Choo, J. SERS-based immunoassay using a gold array-embedded gradient microfluidic chip. *Lab Chip* **12**, 3720 (2012).
 30. Fu, X. *et al.* A SERS-based lateral flow assay biosensor for highly sensitive detection of HIV-1 DNA. *Biosens. Bioelectron.* **78**, 530–537 (2016).
 31. Wang, X. *et al.* Simultaneous detection of dual nucleic acids using a SERS-based lateral flow assay biosensor. *Anal. Chem.* **89**, 1163–1169 (2017).
 32. Koraka, P., Zeller, H., Niedrig, M., Osterhaus, A. D. M. E. & Groen, J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect.* **4**, 1209–1215 (2002).
 33. Peeling, R. W. *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, S30–S37 (2010).
 34. Balm, M. N. D. *et al.* A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *J. Med. Virol.* **84**, 1501–1505 (2012).
 35. Lee, S. *et al.* Fabrication of SERS-fluorescence dual modal nanoprobe and application to multiplex cancer cell imaging. *Nanoscale* **4**, 124 (2012).
 36. 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. *Anal. Chim. Acta* **693**, 7–25 (2011).
 37. Cao, Y., Li, D., Jiang, F., Yang, Y. & Huang, Z. Engineering Metal Nanostructure for SERS Application. *J. Nanomater.* **2013**, 1–12 (2013).
 38. Zhang, Y., Zhou, W., Xue, Y., Yang, J. & Liu, D. Multiplexed Imaging of Trace

- Residues in a Single Latent Fingerprint. *Anal. Chem.* **88**, 12502–12507 (2016).
39. Berger, A. G., Restaino, S. M. & White, I. M. Vertical-flow paper SERS system for therapeutic drug monitoring of flucytosine in serum. *Anal. Chim. Acta* **949**, 59–66 (2017).
 40. Wang, R. *et al.* A microfluidic chip based on an ITO support modified with Ag-Au nanocomposites for SERS based determination of melamine. *Microchim. Acta* **184**, 279–287 (2017).
 41. Feliu, N. *et al.* SERS Quantification and Characterization of Proteins and Other Biomolecules. *Langmuir* **33**, 9711–9730 (2017).
 42. Cialla-May, D., Zheng, X.-S., Weber, K. & Popp, J. Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 3945–3961 (2017).
 43. Li, M., Kang, J. W., Sukumar, S., Dasari, R. R. & Barman, I. Multiplexed detection of serological cancer markers with plasmon-enhanced Raman spectro-immunoassay. *Chem. Sci.* **6**, 3906–3914 (2015).
 44. Nie, S. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **275**, 1102–1106 (1997).
 45. Li, M. *et al.* Three-dimensional hierarchical plasmonic nano-architecture enhanced surface-enhanced Raman scattering immunosensor for cancer biomarker detection in blood plasma. *ACS Nano* **7**, 4967–4976 (2013).
 46. Li, J. F. *et al.* Surface analysis using shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nat. Protoc.* **8**, 52–65 (2013).
 47. Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C. & Dupont-Rouzeyrol, M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 84–86 (2015).
 48. Charrel, R. N. *et al.* Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bull. World Health Organ.* **94**, 574–584D (2016).
 49. Zika virus infection: global update on epidemiology and potentially associated clinical manifestations. *Relev. Epidemiol. Hebd.* **91**, 73–81 (2016).
 50. Fauci, A. S. & Morens, D. M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. *N. Engl. J. Med.* **374**, 601–604 (2016).
 51. Gulland, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ* **352**, i657 (2016).
 52. Kleber de Oliveira, W. *et al.* Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy — Brazil, 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 242–247 (2016).
 53. Musso, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. *J. Clin. Virol.* **68**, 53–55 (2015).
 54. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids II. *J. Am. Chem. Soc.* **39**, 1848–1906 (1917).
 55. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 2221–2295 (1916).
 56. Petty, M. C. *Langmuir-Blodgett Films: An Introduction*. (1996).
 57. Peng, J. B., Barnes, G. T. & Gentle, I. R. The structures of Langmuir–Blodgett films of fatty acids and their salts. *Adv. Colloid Interface Sci.* **91**, 163–219 (2001).
 58. KSV 2000 Instruments - Software Manual. Disponível em www.ksvltda.com. (2001).
 59. Barros, A. M., Dhanabalan, A., Constantino, C. J. L., Balogh, D. T. & Oliveira, O. N. Langmuir monolayers of lignins obtained with different isolation methods.

- Thin Solid Films* **354**, 215–221 (1999).
60. Pasquini, D., Balogh, D. T., Oliveira, O. N. & Curvelo, A. A. S. Lignin molecular arrangements in Langmuir and Langmuir-Blodgett films: The influence of extraction processes. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **252**, 193–200 (2005).
 61. Constantino, C. J. L., Dhanabalan, A. & Oliveira, O. N. Experimental artifacts in the surface pressure measurement for lignin monolayers in Langmuir troughs. *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 3674 (1999).
 62. Silva, J. R., Agnol, F. F. D. & Jr, O. N. O. Temperature dependence of photoinduced birefringence in mixed Langmuir-Blodgett (LB) films of azobenzene-containing polymers. *Polymer (Guildf)*. **43**, 3753–3757 (2002).
 63. Riul, A., Mattoso, L. H. C., Mello, S. V., Telles, G. D. & Oliveira, O. N. Langmuir and Langmuir-Blodgett films of parent polyaniline doped with functionalized acids. *Synth. Met.* **71**, 2067–2068 (1995).
 64. Borovkov, V. V. *et al.* Molecular organization and syn $\rightleftharpoons$ anti conformational equilibria in ethane-bridged bis(zinc porphyrin) floating films at the air-water interface. *Surf. Sci.* **572**, 66–76 (2004).
 65. Valli, L. *et al.* Ethane-Bridged Zinc Porphyrin Dimers in Langmuir–Schaefer Thin Films: Structural and Spectroscopic Properties. *J. Phys. Chem. B* **110**, 4691–4698 (2006).
 66. Li, C. & Imae, T. Protoporphyrin IX Zinc(II) Organization at the Air/Water Interface and Its Langmuir–Blodgett Films. *Langmuir* **19**, 779–784 (2003).
 67. Blodgett, K. B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 1007–1022 (1935).
 68. Ferreira, M., Caetano, W., Itri, R., Tabak, M. & Oliveira, O. N. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). *Quim. Nova* **28**, 502–510 (2005).
 69. Constantino, C. J. L. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett de Ligninas. (1999).
 70. Langmuir, I. & Schaefer, V. J. Composition of Fatty Acid Films on Water Containing Calcium or Barium Salts. *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 284–287 (1936).
 71. Langmuir, I., Schaefer, V. J. & Wrinch, D. M. Built-up films of proteins and their properties. *Science* **85**, 76–80 (1937).
 72. Hoenig, D. & Moebius, D. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *J. Phys. Chem.* **95**, 4590–4592 (1991).
 73. Brewster, D. On the Laws Which Regulate the Polarisation of Light by Reflexion from Transparent Bodies. *Philos. Trans. R. Soc. London* **105**, 125–159 (1815).
 74. Sears, Francis Weston; Zemansky, Mark Waldo; Young, Hugh D.; Freedman, R. A. *Física IV - Ótica e Física Moderna*. (2009).
 75. Halliday, David; Resnick, Robert; Walker, J. *Fundamentos de Física*. (2009).
 76. Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **330**, 377–445 (1908).
 77. Meier, S. A. *Plasmonics fundamentals and applications*. (2007).
 78. Le Ru & Etchegoin, P. G. *Principles of surface enhanced Raman spectroscopy (and related plasmonic effects)*. (2009).
 79. Nie, S. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **275**, 1102–1106 (1997).
 80. Camden, J. P. *et al.* Probing the structure of single-molecule surface-enhanced Raman scattering hot spots. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12616–12617 (2008).
 81. Willets, K. A. & Van Duyne, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance

- Spectroscopy and Sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 267–297 (2007).
82. Garcia, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **44**, 283001 (2011).
 83. Linic, S., Christopher, P. & Ingram, D. B. Plasmonic-metal nanostructures for efficient conversion of solar to chemical energy. *Nat. Mater.* **10**, 911–921 (2011).
 84. Fleischmann, M., Hendra, P. J. & McQuillan, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163–166 (1974).
 85. Jeanmaire, D. L. & Van Duyne, R. P. Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J. Electroanal. Chem.* **84**, 1–20 (1977).
 86. Albrecht, M. G. & Creighton, J. A. Anomalous Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5215–5217 (1977).
 87. Moskovits, M. Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. *J. Chem. Phys.* **69**, 4159–4161 (1978).
 88. Gersten, J. & Nitzan, A. Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles. *J. Chem. Phys.* **75**, 1139–1152 (1981).
 89. Kneipp, K., Moskovits, M. & Kneipp, H. *Surface-enhanced raman scattering physics and applications. Topics in Applied Physics* **103**, (2006).
 90. Kneipp, J., Kneipp, H. & Kneipp, K. SERS—a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1052 (2008).
 91. Kovacs, G. J., Loutfy, R. O., Vincett, P. S., Jennings, C. & Aroca, R. Distance dependence of SERS enhancement factor from Langmuir-Blodgett monolayers on metal island films: evidence for the electromagnetic mechanism. *Langmuir* **2**, 689–694 (1986).
 92. Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. Rigorous justification of the $|E|^4$ enhancement factor in Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **423**, 63–66 (2006).
 93. Jensen, L., Aikens, C. M. & Schatz, G. C. Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1061 (2008).
 94. Shorygin, P. P. & Krushinskij, L. L. Early Days and Later Development of Resonance Raman Spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **28**, 383–388 (1997).
 95. Lombardi, J. R. & Birke, R. L. A unified view of surface-enhanced raman scattering. *Acc. Chem. Res.* **42**, 734–742 (2009).
 96. Campion, A. & Kambhampati, P. Surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **27**, 241 (1998).
 97. Aroca, R. F. *et al.* *Amplificación plasmónica de espectros Raman y de fluorescencia: SERS y SEF sobre nanoestructuras metálicas.* (2014).
 98. Otto, A., Mrozek, I., Grabhorn, H. & Akemann, W. Surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Physics: Condensed Matter* **4**, 1143–1212 (1992).
 99. Otto, A. Surface-enhanced Raman scattering of adsorbates. *Journal of Raman Spectroscopy* **22**, 743–752 (1991).
 100. Geddes, C. D. & Lakowicz, J. R. Metal-Enhanced Fluorescence. *J. Fluoresc.* **12**, 121–129 (2002).
 101. Wokaun, A., Lutz, H. P., King, A. P., Wild, U. P. & Ernst, R. R. Energy transfer in surface enhanced luminescence. *J. Chem. Phys.* **79**, 509–514 (1983).
 102. Anger, P., Bharadwaj, P. & Novotny, L. Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **96**, 113002–113004 (2006).
 103. Tam, F., Goodrich, G. P., Johnson, B. R. & Halas, N. J. Plasmonic enhancement of molecular fluorescence. *Nano Lett.* **7**, 496–501 (2007).
 104. Chance, R. R., Prock, A. & Silbey, R. Molecular fluorescence and energy

- transfer near interfaces. *Adv. Chem. Phys.* **X**, 1–65 (1978).
105. Antunes, P. A., Constantino, C. J. L., Aroca, R. F. & Duff, J. Langmuir and Langmuir-Blodgett films of perylene tetracarboxylic derivatives with varying alkyl chain length: Film packing and surface-enhanced fluorescence studies. *Langmuir* **17**, 2958–2964 (2001).
 106. Adler, A. D., Longo, F. R., Kampas, F. & Kim, J. On the preparation of metalloporphyrins. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **32**, 2443–2445 (1970).
 107. dos Santos, F. A. B. *et al.* Synthesis of functionalized chlorins sterically-prevented from self-aggregation. *Dye. Pigment.* **99**, 402–411 (2013).
 108. Estevão, B. M. *et al.* Interaction of eosin and its ester derivatives with aqueous biomimetic micelles: Evaluation of photodynamic potentialities. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **287**, 30–39 (2014).
 109. Grabar, K. C., Freeman, R. G., Hommer, M. B. & Natan, M. J. Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal. Chem.* **67**, 735–743 (1995).
 110. Grandi, S., Tomasi, C., Mustarelli, P., Clemente, F. & Carbonaro, C. M. Characterisation of a new sol-gel precursor for a SiO₂-rhodamine 6G hybrid class II material. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **41**, 57–63 (2007).
 111. Young, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C. & Halloran, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1053–1057 (2000).
 112. Yen, C.-W. *et al.* Multicolored silver nanoparticles for multiplexed disease diagnostics: distinguishing dengue, yellow fever, and Ebola viruses. *Lab Chip* **15**, 1638–41 (2015).
 113. Minghim, R., Paulovich, F. V & de Andrade Lopes, A. Content-based text mapping using multi-dimensional projections for exploration of document collections. *Proc. SPIE* **6060**, 60600S–60600S–12 (2006).
 114. Paulovich, F. V. *et al.* Information visualization techniques for sensing and biosensing. *Analyst* **136**, 1344 (2011).
 115. Bergeron, J. A., Gaines, G. L. & Bellamy, W. D. Monolayers of porphyrin esters: Spectral disturbances and molecular interactions. *J. Colloid Interface Sci.* **25**, 97–106 (1967).
 116. Jin, J. *et al.* Steady-State Spectroscopic and Photovoltage Studies of Hemin and Hemin/ n -Octadecylamine Langmuir–Blodgett Films. *Langmuir* **15**, 6969–6974 (1999).
 117. Karl M. Kadish. *The Porphyrin Handbook: Synthesis and organic chemistry.* (2000).
 118. A. S. Davydov. *Theory of molecular excitons.* (1962).
 119. V. Ramamurthy. *Photochemistry in organized and constrained media.* (1991).
 120. Adachi, M., Yoneyama, M. & Nakamura, S. Pressure-induced changes in the absorption spectrum of monolayers at the air/water interface: comparison of calculations with experiments. *Langmuir* **8**, 2240–2246 (1992).
 121. Gong, X., Milic, T., Xu, C., Batteas, J. D. & Drain, C. M. Preparation and Characterization of Porphyrin Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14290–14291 (2002).
 122. Boucher, L. J. & Katz, J. J. The Infrared Spectra of Metalloporphyrins (4000-160 Cm⁻¹). *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1340–1345 (1967).
 123. Chowdhury, J., Ghosh, M., Pal, P. & Misra, T. Concentration-dependent surface-enhanced resonance Raman scattering of a porphyrin derivative adsorbed on colloidal silver particles. *J. Colloid Interface Sci.* **263**, 318–326 (2003).

124. Zhang & Imae, T. Hydrogen-Bonding Stabilized Self-Assembled Monolayer Film of a Functionalized Diacid, Protoporphyrin IX Zinc(II), onto a Gold Surface. *Nano Lett.* **1**, 241–243 (2001).
125. Aroca, R. & Thedchanamoorthy, A. Vibrational studies of molecular organization in evaporated phthalocyanine thin solid films. *Chem. Mater.* **7**, 69–74 (1995).
126. Gobernado-Mitre, I., Aroca, R. & DeSaja, J. A. Vibrational Spectra and Molecular Organization in Thin Solid Films of 2,3-Naphthalocyanines. *Chem. Mater.* **7**, 118–122 (1995).
127. Debe, M. K. Optical probes of organic thin films: Photons-in and photons-out. *Prog. Surf. Sci.* **24**, 1–282 (1987).
128. Alessio, P. Sensores para sistemas líquidos diluídos combinando Raman amplificado em superfície (SERS) e língua eletrônica. (2012).
129. Facci, P., Fontana, M. P., Dalcanale, E., Costa, M. & Sacchelli, T. Molecular Reorganization in Langmuir–Blodgett Films of Mesogenic Zn–Porphyrin Octaesters. *Langmuir* **16**, 7726–7730 (2000).
130. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55 (1951).
131. Cañamares, M. V., Garcia-Ramos, J. V., Gómez-Varga, J. D., Domingo, C. & Sanchez-Cortes, S. Comparative Study of the Morphology, Aggregation, Adherence to Glass, and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Silver Nanoparticles Prepared by Chemical Reduction of Ag^+ Using Citrate and Hydroxylamine. *Langmuir* **21**, 8546–8553 (2005).
132. Behrens, S. H. & Grier, D. G. The charge of glass and silica surfaces. *J. Chem. Phys.* **115**, 6716 (2001).
133. J.T. Davies; E.K. Rideal. *Interfacial Phenomena*. (1963).
134. Torrano, A. A., Pereira, A. S., Oliveira, O. N. & Barros-Timmons, A. Probing the interaction of oppositely charged gold nanoparticles with DPPG and DPPC Langmuir monolayers as cell membrane models. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **108**, 120–126 (2013).
135. Zhang, Z. *et al.* A Self-Assembled Monolayer of an Alkanoic Acid-Derivatized Porphyrin on Gold Surface: A Structural Investigation by Surface Plasmon Resonance, Ultraviolet–Visible, and Infrared Spectroscopies. *J. Colloid Interface Sci.* **243**, 382–387 (2001).
136. Boeckl, M. S. *et al.* Self-Assembly of Tetraphenylporphyrin Monolayers on Gold Substrates. *Langmuir* **16**, 5644–5653 (2000).
137. Hajduková-Šmídová, N., Procházka, M. & Osada, M. SE(R)RS excitation profile of free-base 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphyrin on immobilized gold nanoparticles. *Vib. Spectrosc.* **62**, 115–120 (2012).
138. Qu, J., Arnold, D. P. & Fredericks, P. M. Concentration dependence of the SERS of some water-soluble cationic porphyrins on an electrochemically prepared silver surface. *J. Raman Spectrosc.* **31**, 469–473 (2000).
139. Hajduková, N., Procházka, M., Štěpánek, J. & Špírková, M. Chemically reduced and laser-ablated gold nanoparticles immobilized to silanized glass plates: Preparation, characterization and SERS spectral testing. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **301**, 264–270 (2007).
140. Muthukumar, P. & Abraham John, S. Synergistic effect of gold nanoparticles and amine functionalized cobalt porphyrin on electrochemical oxidation of hydrazine. *New J. Chem.* **38**, 3473 (2014).
141. Okamoto, T; Yamaguchi, I. Optical absorption study of the surface plasmon

- resonance in gold nanoparticles immobilized onto a gold substrate by self-assembly technique. *J. Phys. Chem. B* **107**, 10321–10324 (2003).
142. Seitz, O. *et al.* Preparation and characterisation of gold nanoparticle assemblies on silanised glass plates. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **218**, 225–239 (2003).
 143. Palik, E. D. Handbook of Optical Constants of Solids. *Handbook of Optical Constants of Solids* (1997).
 144. Alcaraz de la Osa, R., Albella, P., Saiz, J. M., González, F. & Moreno, F. Extended discrete dipole approximation and its application to bianisotropic media. *Opt. Express* **18**, 23865 (2010).
 145. Ibraev, N. K. & Zhunusbekov, A. M. Kinetics of long-lived luminescence of eosin in Langmuir-Blodgett films. *Opt. Spectrosc.* **92**, 178–181 (2002).
 146. Mishra, H., Mali, B. L., Karolin, J., Dragan, A. I. & Geddes, C. D. Experimental and theoretical study of the distance dependence of metal-enhanced fluorescence, phosphorescence and delayed fluorescence in a single system. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 19538–19544 (2013).
 147. Evale, B. G., Hanagodimath, S. M. & Kulkarni, M. V. Effect of temperature on the fluorescence emission of 2H-chromen-2-one derivative in non-polar and polar solvents. *J. Lumin.* **130**, 1325–1329 (2010).
 148. Yan, D. P. *et al.* Reversibly Thermochromic, Fluorescent Ultrathin Films with a Supramolecular Architecture. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 720–723 (2011).
 149. Caldarola, M. *et al.* Non-plasmonic nanoantennas for surface enhanced spectroscopies with ultra-low heat conversion. *Nat Commun* **6**, (2015).
 150. Weitz, D. a, Garoff, S., Hanson, C. D., Gramila, T. J. & Gersten, J. I. Fluorescent lifetimes of molecules on silver-island films. *Opt. Lett.* **7**, 89–91 (1982).
 151. Weitz, D. A., Garoff, S., Hanson, C. D., Gramila, T. J. & Gersten, J. I. Fluorescent lifetimes and yields of molecules adsorbed on silver-island films. *J. Lumin.* **24–25**, 83–86 (1981).
 152. Dulkeith, E. *et al.* Fluorescence Quenching of Dye Molecules near Gold Nanoparticles: Radiative and Nonradiative Effects. *Phys. Rev. Lett.* **89**, (2002).
 153. Li, J. F. *et al.* Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nature* **464**, 392–395 (2010).
 154. Hirt, R. C., Halverson, F. & Schmitt, R. G. s-Triazine. II. The Near Ultraviolet Absorption Spectrum. *J. Chem. Phys.* **22**, 1148–1149 (1954).
 155. Mourão, H. A. J. L., Malagutti, A. R. & Ribeiro, C. Synthesis of TiO₂-coated CoFe₂O₄ photocatalysts applied to the photodegradation of atrazine and rhodamine B in water. *Appl. Catal. A Gen.* **382**, 284–292 (2010).
 156. Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668–677 (2003).
 157. Furini, L. N. *et al.* Detection and quantitative analysis of carbendazim herbicide on Ag nanoparticles via surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.* **46**, 1095–1101 (2015).
 158. Li, J.-F., Li, C.-Y. & Aroca, R. F. Plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 3962–3979 (2017).
 159. Bryant, M. A. & Pemberton, J. E. Surface Raman scattering of self-assembled monolayers formed from 1-alkanethiols at silver [electrodes]. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 3629–3637 (1991).
 160. Larkin, P. J., Makowski, M. P. & Colthup, N. B. The form of the normal modes of s-triazine: infrared and Raman spectral analysis and ab initio force field

- calculations. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **55**, 1011–1020 (1999).
161. Cintă, S., Iliescu, T., Venter, M. & Cozar, O. Vibrational and orientation studies of 2,4-diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine on a colloidal silver surface. *J. Mol. Struct.* **410–411**, 189–192 (1997).
 162. Costa, J. C. S., Ando, R. A., Camargo, P. H. C. & Corio, P. Understanding the Effect of Adsorption Geometry over Substrate Selectivity in the Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Simazine and Atrazine. *J. Phys. Chem. C* **115**, 4184–4190 (2011).
 163. Rubira, R. J. G. *et al.* Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization. *Colloid Polym. Sci.* **292**, 2811–2820 (2014).
 164. Bonora, S. *et al.* Raman and SERS study on atrazine, prometryn and simetryn triazine herbicides. *J. Mol. Struct.* **1040**, 139–148 (2013).
 165. Aoki, P. H. B. *et al.* SERS Mapping in Langmuir–Blodgett Films and Single-Molecule Detection. *Appl. Spectrosc.* **67**, 563–569 (2013).
 166. Tang, X., Cai, W., Yang, L. & Liu, J. Highly uniform and optical visualization of SERS substrate for pesticide analysis based on Au nanoparticles grafted on dendritic [small alpha]-Fe₂O₃. *Nanoscale* **5**, 11193–11199 (2013).
 167. Zhang, L. Self-assembly Ag nanoparticle monolayer film as SERS Substrate for pesticide detection. *Appl. Surf. Sci.* **270**, 292–294 (2013).
 168. Li, D.-W., Zhai, W.-L., Li, Y.-T. & Long, Y.-T. Recent progress in surface enhanced Raman spectroscopy for the detection of environmental pollutants. *Microchim. Acta* **181**, 23–43 (2013).
 169. USEPA. *United States Environmental Protection Agency*. (2014).
 170. Shah, J., Jan, M. R., Ara, B. & Shehzad, F. Determination of ametryn in sugarcane and ametryn–atrazine herbicide formulations using spectrophotometric method. *Environ. Monit. Assess.* **184**, 3463–3468 (2012).
 171. Homer M. LeBaron, Janis E. McFarland, O. B. *The Triazine Herbicides: 50 Years Revolutionizing Agriculture*. Elsevier (2008).
 172. Fort, E. & Grésillon, S. Surface enhanced fluorescence. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **41**, 13001 (2008).
 173. Lakowicz, J. R. Radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications. *Anal. Biochem.* **298**, 1–24 (2001).
 174. Camacho, S. A. *et al.* Increasing the Enhancement Factor in Plasmon-Enhanced Fluorescence with Shell-Isolated Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **120**, 20530–20535 (2016).
 175. Fan, M., Wang, P., Escobedo, C., Sinton, D. & Brolo, A. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) optrodes for multiplexed on-chip sensing of nile blue A and oxazine 720. *Lab Chip* **12**, 1554–1560 (2012).
 176. Fan, M. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering (SERS) from Au:Ag bimetallic nanoparticles: the effect of the molecular probe. *Chem. Sci.* **4**, 509–515 (2013).
 177. Kneipp, K., Kneipp, H. & Kneipp, J. Surface-enhanced raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates - From single-molecule raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells. *Acc. Chem. Res.* **39**, 443–450 (2006).
 178. Le Ru, E. C., Etchegoin, P. G. & Meyer, M. Enhancement factor distribution around a single surface-enhanced Raman scattering hot spot and its relation to single molecule detection. *J. Chem. Phys.* **125**, 204701 (2006).
 179. Antonov, L. UV–Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of

- ionic dyes in water. *Talanta* **49**, 99–106 (1999).
180. Le Ru, E. C., Etchegoin, P. G. & Meyer, M. Enhancement factor distribution around a single surface-enhanced Raman scattering hot spot and its relation to single molecule detection. *J. Chem. Phys.* **125**, 204701 (2006).
 181. Bharadwaj, P. & Novotny, L. Spectral dependence of single molecule fluorescence enhancement. *Opt. Express* **15**, 14266 (2007).
 182. Zhang, W. H. *et al.* Giant and uniform fluorescence enhancement over large areas using plasmonic nanodots in 3D resonant cavity nanoantenna by nanoimprinting. *Nanotechnology* **23**, 225301, (2012).
 183. Jose, J., Ueno, Y. & Burgess, K. Water-soluble nile blue derivatives: syntheses and photophysical properties. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 418–423 (2009).
 184. Su, G.-J., Yin, S.-X., Wan, L.-J., Zhao, J.-C. & Bai, C.-L. Dimerization of three xanthene dyes on Au(111) surface. *Surf. Sci.* **551**, 204–212 (2004).
 185. Kim, J. H. *et al.* Clinical diagnosis of early dengue infection by novel one-step multiplex real-time RT-PCR targeting NS1 gene. *J. Clin. Virol.* **65**, 11–19 (2015).
 186. Adungo, F. *et al.* Development and Characterization of Monoclonal Antibodies to Yellow Fever Virus and Application in Antigen Detection and IgM Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Vaccine Immunol.* **23**, 689–697 (2016).
 187. Dussart, P. *et al.* Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 1185–1189 (2006).
 188. Shrivastava, A., Gupta, V. & Article, R. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* **2**, 21–25 (2011).
 189. Harris, E. *et al.* Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2634–2639 (1998).
 190. Bhatt, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504–507 (2013).
 191. Koraka, P., Zeller, H., Niedrig, M., Osterhaus, A. D. M. . & Groen, J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect.* **4**, 1209–1215 (2002).
 192. Jiji, S. G. & Gopchandran, K. G. Au@Ag hollow nanostructures with tunable SERS properties. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **171**, 499–506 (2017).
 193. Maier, S. A. *Plasmonics: Fundamentals and applications. Plasmonics: Fundamentals and Applications* (2007).
 194. Ozaki, Y., Aroca, R., Kneipp, K. *Frontiers of Surface-Enhanced Raman Scattering*. John Wiley & Sons, Ltd, (2014).
 195. Chrispal, A. *et al.* Acute undifferentiated febrile illness in adult hospitalized patients: the disease spectrum and diagnostic predictors - an experience from a tertiary care hospital in South India. *Trop. Doct.* **40**, 230–234 (2010).
 196. Notices, F. R. *Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls*. (2000).
 197. Sha, M. Y., Xu, H., Natan, M. J. & Cromer, R. Surface-Enhanced Raman Scattering Tags for Rapid and Homogeneous Detection of Circulating Tumor Cells in the Presence of Human Whole Blood. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 17214–17215 (2008).

198. Wang, Y., Yan, B. & Chen, L. SERS Tags: Novel Optical Nanoprobes for Bioanalysis. *Chem. Rev.* **113**, 1391–1428 (2013).
199. Li, X. *et al.* A SERS nano-tag-based fiber-optic strategy for in situ immunoassay in unprocessed whole blood. *Biosens. Bioelectron.* **92**, 517–522 (2017).
200. WHO. *Zika virus (ZIKV) Surveillance in the Americas: Interim guidance for laboratory detection and diagnosis.* (2015).
201. Homan, J., Malone, R. W., Darnell, S. J. & Bremel, R. D. Antibody mediated epitope mimicry in the pathogenesis of Zika virus related disease. *bioRxiv* 44834 (2016).
202. Sánchez-Purrà, M. *et al.* Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Sandwich Immunoassays for Multiplexed Detection of Zika and Dengue Viral Biomarkers. *ACS Infect. Dis.* **3**, 767–776 (2017).