

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Moyra Freitas Vieira**

**Preparação e caracterização de filmes de nanocompósitos de poliestireno-b-poli(2-  
vinilpiridina) contendo nanopartículas de ouro organizadas para aplicação como substratos e  
biossensores SERS**

**Juiz de Fora**

**2023**

**Moyra Freitas Vieira**

**Preparação de filmes poliméricos contendo nanopartículas metálicas com organização em escala micro/nanométrica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química. Área de concentração: Inorgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Celly Mieko Shinohara Izumi  
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Alves Dias

Juiz de Fora  
2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vieira, Moyra Freitas.

Preparação e caracterização de filmes de nanocompósitos de poliestireno-b-poli(2-vinilpiridina) contendo nanopartículas de ouro organizadas para aplicação como substratos e biossensores SERS /

Moyra Freitas Vieira. -- 2023.

125 p.

Orientador: Izumi Celly Mieko Shinohara

Coorientador: Dias Rodrigo Alves

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

1. Copolímero em dibloco. 2. Nanopartículas de ouro. 3. SERS. 4. Biossensor. 5. Catálise plasmônica. I. Celly Mieko Shinohara , Izumi , orient. II. Rodrigo Alves, Dias, coorient. III. Título.

**Moyra Freitas Vieira**

**Preparação e caracterização de filmes de nanocompósitos de poliestireno-b-poli(2-vinilpiridina) contendo nanopartículas de ouro organizadas para aplicação como substratos e biossensores SERS**

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

Aprovada em 28 de agosto de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Celly Mieko Shinohara Izumi** - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Prof. Dr. Jairo Tronto**

Universidade Federal de Viçosa

**Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Maribel Coromoto Navarro Acosta**

Juiz de Fora, 09/08/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Celly Mieko Shinohara Izumi, Professor(a)**, em 28/08/2023, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Sant Ana, Professor(a)**, em 28/08/2023, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Ferreira Leite Santos, Usuário Externo**, em 28/08/2023, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maribel Coromoto Navarro Acosta, Professor(a)**, em 28/08/2023, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jairo Tronto, Usuário Externo**, em 28/08/2023, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1400209** e o código CRC **7AB9F406**.

Dedico este trabalho aos meus pais, Deise e João, pelo amor e apoio em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão por todo carinho, paciência, apoio e confiança.

À minha orientadora professora Dra. Celly M. S. Izumi pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao meu coorientador professor Dr. Rodrigo Alves Dias pela disposição e paciência de me ajudar no projeto de desenvolvimento do equipamento de *dip-coating*.

Ao professor Dr. Alexandre Brolo pela recepção calorosa na Universidade de Victoria – Canadá e pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas Ana e Bruno pela ajuda no projeto desenvolvido no Canadá.

Aos professores Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade e Dr. Antônio Sant’Ana pela contribuição no desenvolvimento do projeto.

Esta pesquisa utilizou instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). A equipe da Divisão de Nanomateriais (Laboratório de Microscopia de Força Atômica) é reconhecida pela assistência durante os experimentos (proposta 20210506 - AFM-27489).

Ao Carlos Alberto Rodrigues Costa do LNNano situado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pela ajuda na obtenção das medidas de Microscopia de Força Atômica e por me proporcionar o treinamento no equipamento.

Ao Dr. Bráulio S. Archanjo do INMETRO pela colaboração na obtenção das medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão e por permitir que eu fosse treinada a manusear os equipamentos Tecnai e Magellan.

Aos meus amigos de laboratório: Bismark, Beatriz, Flávia, Gabriela, Ramon, William, Álvaro e aos demais alunos do grupo LabNano.

Parte desse trabalho foi realizada durante uma bolsa de estudos apoiada pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES - Edital nº 19/2020 - Seleção 2020) na Universidade de Victoria. Financiado pela CAPES - Agência Federal Brasileira de Apoio e Avaliação da Educação Superior, vinculada ao Ministério da Educação do Brasil.

Aos órgãos de fomento: FAPEMIG, UFJF, CNPq.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Este estudo investiga o processo de auto-organização de nanopartículas de Au (AuNP) utilizando o copolímero em dibloco poli(estireno-*b*-2-vinilpiridina) (PS-*b*-P2VP). Foram empregados PS-*b*-P2VP com diferentes pesos moleculares e frações volumétricas de PS/P2VP e AuNPs pré-sintetizadas. Os filmes de PS-*b*-P2VP depositados em um substrato de vidro foram submetidos a diferentes procedimentos de reconstrução, incluindo imersão em água ou etanol, exposição a vapor de tolueno/THF, ou tratamento térmico. Esses filmes reconstruídos foram posteriormente imersos em suspensões de AuNPs estabilizadas por citrato por diferentes intervalos de tempo. Os microdomínios de P2VP atuaram seletivamente como sítio para ligação das nanopartículas carregadas negativamente por meio de interações eletrostáticas. Os substratos foram caracterizados por espectroscopia UV-VIS e microscopia de força atômica. A Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) foi utilizada, usando o corante Azul do Nilo (NB), para verificar a intensificação do sinal Raman dos filmes produzidos. Os resultados evidenciaram que os tratamentos e o peso molecular dos copolímeros influenciam significativamente a dispersão das nanopartículas e, conseqüentemente, a intensificação do sinal SERS. O processo de reticulação utilizando o 1,4-diiodobutano (DIB) como agente reticulante foi realizado para impedir possíveis reconstruções dos filmes de PS-*b*-P2VP pela solução coloidal, e conseqüente mudança da morfologia final dos filmes de AuNPs/PS-*b*-P2VP. Os resultados também revelaram que a reticulação dos filmes de AuNPs/PS-*b*-P2VP influencia diretamente na organização das AuNPs. Os filmes de AuNPs/PS-*b*-P2VP foram testados como substratos SERS reutilizáveis. Os corantes Azul do Nilo e Rodamina-6G foram empregados como molécula prova. Após a obtenção dos espectros SERS destes corantes, o filme foi exposto à radiação UV e através de fotocatalise, o corante foi degradado. O substrato continuou SERS ativo mesmo após 4 ciclos de uso e “limpeza”. Os filmes de AuNPs/PS-*b*-P2VP também foram empregados para detectar diretamente a imunoglobulina G humana (IgG) e o trifosfato de adenosina (ATP). Espectroscopia UV-VIS e SERS foram usadas para caracterizar cada etapa da funcionalização do substrato e a interação específica entre o anti-IgG e o analito IgG alvo. Os resultados de UV-VIS mostram um deslocamento para o vermelho da banda LSPR (*Localized Surface Plasmon Resonance*) conforme a superfície de AuNP foi funcionalizada, e as medidas de SERS mostraram mudanças consistentes nas características espectrais. A análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*) foi usada para discriminar entre as amostras antes e depois dos testes de afinidade. Adicionalmente, o biossensor projetado exibiu sensibilidade a diferentes



concentrações de IgG e ATP, com um limite de detecção (LD) de até 1,0 µg/mL. Por fim, foi apresentada a construção de um equipamento de *dip-coating* utilizando materiais reaproveitados de sucatas. Por meio desse equipamento, filmes *layer-by-layer* automontados de AuNP/PS-b-P2VP foram fabricados. Os resultados obtidos por espectroscopia UV-VIS e Raman mostraram que, à medida que o número de bicamadas aumenta, há um aumento gradual na concentração de AuNPs adsorvidas. Assim, o equipamento de *dip-coating* construído mostrou-se eficaz na produção de filmes finos com nanopartículas adsorvidas em matrizes poliméricas.

**Palavras-chave:** Copolímero em dibloco. Nanopartículas de ouro. SERS. Biossensor. Catálise plasmônica. Spin-coating. Dip-coating.

## ABSTRACT

This study investigates the self-assembly process of gold nanoparticles (AuNPs) using the diblock copolymer poly(styrene-*b*-2-vinylpyridine) (PS-*b*-P2VP). PS-*b*-P2VP with different molecular weights and volume fractions of PS/P2VP, along with pre-synthesized AuNPs, were employed. The PS-*b*-P2VP films on a glass substrate underwent various reconstruction procedures, including immersion in deionized water or ethanol, exposure to toluene/THF vapor, or thermal treatment. These reconstructed films were immersed in citrate-stabilized AuNP suspensions for varying time intervals. The P2VP microdomains selectively acted as binding sites for negatively charged nanoparticles through electrostatic interactions. The substrates were characterized using UV-VIS spectroscopy and atomic force microscopy. The SERS activity was tested using the Nile Blue (NB) dye as a molecular probe. The results revealed that the treatments and copolymer molecular weight strongly influenced nanoparticle dispersion and, consequently, SERS signal enhancement. Cross-linking using 1,4-diiodobutane (DIB) as a cross-linking agent was performed to prevent possible reconstructions of PS-*b*-P2VP films by the colloidal solution, thereby preserving the final morphology of AuNPs/PS-*b*-P2VP films. The results showed that cross-linking the AuNPs/PS-*b*-P2VP films directly influenced the organization of AuNPs. These films were tested as reusable SERS substrates. Nile Blue and Rhodamine-6G dyes were used as molecular probes. After obtaining SERS spectra of these dyes, the film was exposed to UV radiation, leading to the photocatalytic degradation of the dye. The substrate remained SERS-active even after 4 cycles of use and "cleaning." The AuNPs/PS-*b*-P2VP films were also used for the direct detection of human immunoglobulin G (IgG) and adenosine triphosphate (ATP). UV-VIS and SERS spectroscopy were used to characterize each step of substrate functionalization and the specific interaction between anti-IgG and the target analyte, IgG. UV-VIS results showed a redshift of the LSPR band as the AuNP surface was functionalized, and SERS measurements exhibited consistent changes in spectral features. Principal component analysis (PCA) was used to discriminate between samples before and after affinity tests. Furthermore, the designed biosensor demonstrated sensitivity to different concentrations of IgG and ATP, with a detection limit (LOD) of down to 1  $\mu\text{g/mL}$ . Finally, the construction of a dip-coating equipment using recycled materials was presented. Using this equipment, AuNP/PS-*b*-P2VP layer-by-layer self-assembled films were produced. The results obtained through UV-VIS and Raman spectroscopy indicated a gradual increase in the concentration of adsorbed AuNPs as the number of bilayers increased. Thus, the

constructed dip-coating equipment proved to be efficient in producing thin films for nanoparticle adsorption in polymeric matrices.

**Keywords:** Diblock copolymer. Gold nanoparticles. Biosensor. Plasmonic catalysis. Spin-coating. Dip-coating.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do fenômeno de LSPR. ....	20
Figura 2 - Espalhamento elástico (Rayleigh) e inelástico (Stokes e anti-Stokes). ....	21
Figura 3 - Processo de formação de filme fino por (a) spin-coating e por (b) dip-coating. ....	25
Figura 4 - Principais morfologias de filmes finos de di-BC anfífilicos.....	26
Figura 5 - Estrutura química do poliestireno-b-poli(2-vinilpiridina). ....	28
Figura 6 – Esquema de detecção de biomoléculas por SERS. ....	31
Figura 7 - Esquema da preparação dos slides de vidro.....	37
Figura 8 - Esquema para síntese dos filmes finos de PS-b-P2VP. ....	37
Figura 9 - Esquema da síntese de NPs de ouro.....	38
Figura 10 - Espectro de emissão da lâmpada de UV utilizada na fotodegradação.....	39
Figura 11 - Esquema da remoção da molécula prova utilizada no SERS através da fotocatalise plasmônica. ....	40
Figura 12 - Esquema geral de funcionalização do biossensor e detecção do antígeno. ....	41
Figura 13 - Equipamento de dip-coating e (b) projeto para impressora 3D.....	43
Figura 14 - (a) Placa Wemos D1 mini com o chip Wi-Fi ESP8266 e (b) display de LCD 16 x 2 com módulo I2c soldado.....	44
Figura 15 - (a) Imagem representativa de TEM e (b) espectro UV-VIS das NPs de ouro sintetizadas.....	46
Figura 16 - Comparação entre os espectros Raman dos sólidos de: (a) PS, (b) P2VP, (c) PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (d) PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (e) PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> , (f) PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> .....	47
Figura 17 - Espectros Raman dos filmes finos de: (a) PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> , (d) PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> .....	48
Figura 18 – (A) Comparação entre os espectros SERS médios dos filmes finos de: (a) PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> , (d) PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> . (B) Gráfico de intensidade da banda em 1060 cm <sup>-1</sup> , respectivamente.....	49
Figura 19 - Espectros UV-VIS do filme fino de AuNPs adsorvidas em P2VP.....	50
Figura 20 - Mapeamento SERS 50 × 50 μm <sup>2</sup> da banda em 594 cm <sup>-1</sup> do NB adsorvido nos filmes finos de AuNPs em P2VP com diferentes tempos de imersão na solução coloidal: (a) 1 h, (b) 2 h, (c) 3 h, (d) 4 h, (e) 5 h e (f) 6 h. ....	51

Figura 21 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> reconstruídos em H <sub>2</sub> O..	52
Figura 22 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP reconstruídos em H <sub>2</sub> O: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> .	53
Figura 23 - (a) Espectro UV-VIS da solução aquosa da NB, (b) espectro Raman da solução de Azul do Nilo depositada sobre o substrato de vidro ( $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) e (c) estrutura química.	54
Figura 24 - Mapeamento SERS $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ da banda em $594 \text{ cm}^{-1}$ do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP reconstruídos em H <sub>2</sub> O: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> .	55
Figura 25 - Imagens de AFM dos filmes finos (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> – 1 h, (b) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> – 3 h e (c) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> – 6 h, e seus respectivos mapeamentos SERS $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ da banda em $594 \text{ cm}^{-1}$ do NB (d – f).	56
Figura 26 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> reconstruídos em etanol.	57
Figura 27 - Representação esquemática do acoplamento plasmônico entre nanopartículas próximas: (a) polarização transversal e (b) polarização longitudinal.	59
Figura 28 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP reconstruídos em etanol: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> .	59
Figura 29 - Mapeamento SERS $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ da banda em $594 \text{ cm}^{-1}$ do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP reconstruídos em Etanol: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> .	61
Figura 30 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno.	63
Figura 31 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> .	64
Figura 32 - Mapeamento SERS $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ da banda em $594 \text{ cm}^{-1}$ do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> .	65
Figura 33 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS <sub>154</sub> -b-P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> -b-P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> -b-P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> com tratamento térmico.	66

Figura 34 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP com tratamento térmico: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> . .....	67
Figura 35 - Mapeamento SERS 50 × 50 μm <sup>2</sup> da banda em 594 cm <sup>-1</sup> do NB dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP com tratamento térmico: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> . .....	68
Figura 36 - Teste de estabilidade dos filmes finos de (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> reconstruídos em água e dos filmes finos de (e) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (f) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (g) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (h) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> reconstruídos em etanol. ....	69
Figura 37 - Espectros UV-VIS de filmes finos de AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> – 6 h reconstruídos em água. ....	70
Figura 38 - Mapeamento SERS 50 × 50 μm <sup>2</sup> da banda em 594 cm <sup>-1</sup> do NB dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP reconstruídos em H <sub>2</sub> O e imersos em solução coloidal por 6 h; (a) filme 1 e (b) filme 2. ....	71
Figura 39 - Representação do processo de reticulação entre cadeias poliméricas. ....	71
Figura 40 - Comparação entre os espectros UV-VIS do filme fino de AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> – 6 h tratados com água com tempo de exposição de 1 h e 2 h ao agente reticulante. ....	72
Figura 41 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> reconstruídos em água e reticulados. ....	74
Figura 42 - Mapeamento SERS 50 × 50 μm <sup>2</sup> da banda em 594 cm <sup>-1</sup> do NB dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP reconstruídos em H <sub>2</sub> O e reticulados: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> . ....	75
Figura 43 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP reconstruídos em água e reticulados (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> . ....	76
Figura 44 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> reconstruídos em etanol e reticulados. ....	77
Figura 45 - Mapeamento SERS 50 × 50 μm <sup>2</sup> da banda em 594 cm <sup>-1</sup> do NB dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP reconstruídos em etanol e reticulados: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> . ....	78
Figura 46 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno e reticulados. ....	80
Figura 47 - Mapeamento SERS 50 × 50 μm <sup>2</sup> da banda em 594 cm <sup>-1</sup> do NB dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno e reticulados: (a)	

AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> . .....	81
Figura 48 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> reconstruídos termicamente e reticulados. ....	82
Figura 49 - Mapeamento SERS 50 × 50 μm <sup>2</sup> da banda em 594 cm <sup>-1</sup> do NB dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP reconstruídos termicamente e reticulados: (a) AuNP/PS <sub>154</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>33</sub> , (b) AuNP/PS <sub>281</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>157</sub> , (c) AuNP/PS <sub>389</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>381</sub> e (d) AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> . ....	83
Figura 50 - Monitoramento dos espectros Raman médios (n = 100) da molécula de prova (1x10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> ) após cada ciclo de adsorção e degradação por fotocatalise plasmônica. ....	85
Figura 51 - Resposta SERS (banda em 594 cm <sup>-1</sup> ) após cada ciclo de adsorção do corante e degradação por fotocatalise plasmônica. ....	86
Figura 52 - Mapeamento SERS 50 × 50 μm <sup>2</sup> da banda em 594 cm <sup>-1</sup> do NB dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP após imersão no corante: (a) 1° ciclo, (b) 2° ciclo, (c) 3° ciclo e (d) 4° ciclo . ....	87
Figura 53 - (a) Hibridização entre os orbitais do metal e da molécula adsorvida; (b) .....	88
Figura 54 - (a) Espectros SERS e (b) gráfico comparativo das intensidades da banda em 594 cm <sup>-1</sup> das moléculas de azul do Nilo adsorvidas em AuNPs depositas em uma lâmina de vidro. ....	90
Figura 55 - Monitoramento dos espectros Raman médios (n = 100) da molécula de prova (1x10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> ) após imersão no corante: (a) 1° ciclo, (b) 2° ciclo, (c) 3° ciclo e (d) 4° ciclo . ....	91
Figura 56 - Resposta SERS (banda em 615 cm <sup>-1</sup> ) após cada ciclo de adsorção do corante e degradação por fotocatalise plasmônica. ....	92
Figura 57 - Mapeamento SERS 50 × 50 μm <sup>2</sup> da banda em 615 cm <sup>-1</sup> do R6G dos filmes finos de AuNPs em PS- <i>b</i> -P2VP após cada ciclo de fotodegração. ....	93
Figura 58 - Espectros UV-VIS de cada etapa de funcionalização do substrato de AuNPs/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> : (a) AuNPs/PS- <i>b</i> -P2VP; (b) AuNPs/PS- <i>b</i> -P2VP funcionalizado com 11-MUA/MPA; (c) AuNPs/PS- <i>b</i> -P2VP/ 11-MUA/MPA funcionalizado com EDC/NHS; (d) AuNPs/PS- <i>b</i> -P2VP / 11-MUA/MPA / EDC/NHS funcionalizado com anti-IgG e (e) sensor pronto exposto a 150 mg/mL de IgG.....	95
Figura 59 - Espectro SERS médio (n = 100 espectros) de cada etapa da funcionalização do substrato de AuNP/PS <sub>1250</sub> - <i>b</i> -P2VP <sub>1285</sub> e detecção da interação anti-IgG/IgG: (a) AuNPs/PS- <i>b</i> -P2VP; (b) AuNPs/PS- <i>b</i> -P2VP funcionalizado com 11-MUA/MPA; (c) AuNPs/PS- <i>b</i> -P2VP/ 11-MUA/MPA funcionalizado com EDC/NHS; (d) AuNPs/PS- <i>b</i> -P2VP / 11-MUA/MPA / EDC/NHS funcionalizado com anti-IgG e (e) sensor pronto exposto a 150 μg/mL de IgG....	96
Figura 60 - Ativação do grupo carboxila coordenado à superfície da NP.....	97

Figura 61 - Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC1 e PC2 das etapas de funcionalização e detecção do analito. ....	98
Figura 62 - Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC2 e PC3 para uma melhor discriminação entre os dados do sensor antes e depois do imunoensaio (concentração de IgG = 150 mg/mL). ....	99
Figura 63 - Comparação dos espectros SERS médios das amostras de (a) anti-IgG, (b – e) IgG (concentração: 1 a 90 µg/mL).....	100
Figura 64 - Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC1 e PC2 dos espectros SERS (n = 2500 espectros) das amostras de anti-IgG e IgG (1 – 90 mg/mL).....	101
Figura 65 - (A) Comparação dos espectros SERS médios das amostras de (a) anti-IgG, (b) IgG e (c) IgM; (B) Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC1 e PC2 dos espectros SERS (n = 2500 espectros) das amostras de anti-IgG, IgG e IgM. ....	102
Figura 66 – (A) Comparação dos espectros SERS médios das amostras de (a) anti-ATP, (b) ATP (100 µg/mL), (c) ATP (50 µg/mL), (d) ATP (40 µg/mL) e (e) ATP (1 µg/mL). ....	103
Figura 67 - Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC1 e PC3 dos espectros SERS (n = 2500 espectros) das amostras de anti-ATP e ATP. ....	104
Figura 68 - Interface do usuário para operação do equipamento de dip-coating. ....	105
Figura 69 - Espectros UV-VIS dos filmes de PS-b-P2VP com o aumento do tempo de imersão em solução coloidal.....	106
Figura 70 - (a) Espectros UV-VIS dos filmes automontados de AuNP/PS-b-P2VP para cada bicamada depositada; (b) dependência do máximo de extinção com o número de bicamadas. ....	107
Figura 71 - (a) Espectros SERS médios e (b) gráfico comparativo das intensidades da banda em 591 cm <sup>-1</sup> das moléculas de azul do Nilo adsorvidas sobre os filmes automontados.....	108
Figura 72 - PCA da funcionalização e detecção de IgG: (a) Variância, (b) Primeira Componente Principal, (c) Segunda Componente Principal, (d) Terceira Componente Principal.....	120
Figura 73 - PCA da detecção direta de ATP: (a) Variância, (b) Primeira Componente Principal, (c) Segunda Componente Principal, (d) Terceira Componente Principal.....	121



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos reagentes utilizados.....	35
Tabela 2 - Massa molar e índice de polidispersividade do PS-b-P2VP .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11-MUA	11-mercaptoundecanóico
AFM	Microscopia de força atômica
AgNPs	Nanopartículas de prata
anti-ATP	anti-trifosfato de adenosina
anti-IgG	anti-imunoglobulina G
ATP	trifosfato de adenosina
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BCP	Copolímero em bloco
BSA	albumina de sêrum bovino
CNPEM	Centro Nacional de pesquisa em Energia e Materiais
DIB	1,4-diidobutano
di-BC	Copolímero em dibloco
EDC	N-etil N-(3 dietilaminopropil) carbodiimida
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LSPR	Ressonância de plasmon de superfície localizado
Mn	Massa molar numérica
Mw	Massa molar ponderal
NHS	N-hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
OTS	Octadeciltriclorosilano
P2VP	Poli(2-vinilpiridina)
PBS	Tampão fosfato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PS	Poliestireno
PS- <i>b</i> -P2VP	Poliestireno- <i>b</i> -poli(2-vinilpiridina)
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SERS	Espectroscopia Raman intensificada por superfície

SERRS	Espectroscopia Raman Ressonante intensificada por superfície
STM	Microscopia de corrente de tunelamento
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
UV-VIS	Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	20
1.1	ESPALHAMENTO RAMAN E ESPALHAMENTO RAMAN INTENSIFICADO POR SUPERFÍCIE	21
1.2	PREPARAÇÃO DE SUBSTRATOS SERS	24
1.2.1	<b>Produção de filmes finos por spin coating e dip coating</b>	24
1.3	SUBSTRATOS REUTILIZÁVEIS	28
1.4	BIOSSENSORES	29
1.4.1	<b>Biossensores baseados em LSPR</b>	30
1.4.2	<b>Biossensores SERS</b>	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	34
2.1	OBJETIVO GERAL:	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	34
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	35
3.1	TÉCNICAS E EQUIPAMENTOS	36
3.2	MÉTODOS	36
3.2.1	<b>Preparação do substrato de vidro</b>	36
3.2.2	<b>Preparação dos filmes finos de PS-b-P2VP</b>	37
3.2.3	<b>Preparação de filmes finos de PS-b-P2VP reticulados</b>	37
3.2.4	<b>Síntese e adsorção das NPs de ouro</b>	38
3.2.5	<b>Degradação de corantes catalisada por AuNPs</b>	38
3.2.6	<b>Desenvolvimento do sensor para IgG</b>	40
3.2.6.1	<i>Funcionalização do substrato e detecção do antígeno IgG</i>	40
3.2.6.2	<i>Experimento controle</i>	41
3.2.6.3	<i>Detecção de ATP</i>	41
3.2.6.4	<i>Caracterização</i>	42
3.2.7	<b>Construção do Equipamento de <i>dip-coating</i></b>	42
3.2.7.1	<i>Estrutura mecânica:</i>	42

3.2.7.2	<i>Estrutura eletrônica:</i> .....	43
3.2.7.3	<i>Software:</i> .....	44
3.2.7.4	<i>Síntese de filmes finos automontados por dip-coating</i> .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
4.1	SÍNTESE DE NPS DE OURO .....	46
4.2	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS FILMES DE AuNP EM PS-b-P2VP.....	46
4.3	FILMES FINOS DE AUNP EM P2VP .....	49
4.4	FILMES FINOS DE AUNP/PS-B-P2VP RECONSTRUÍDOS EM H <sub>2</sub> O .....	51
4.5	FILMES FINOS DE AUNP/PS-B-P2VP RECONSTRUÍDOS EM ETANOL .....	56
4.7	FILMES FINOS DE AUNP/PS-B-P2VP COM TRATAMENTO TÉRMICO.....	65
4.8	TESTE DE ESTABILIDADE .....	69
4.9	TESTE DE REPRODUTIBILIDADE.....	69
4.10	FILMES FINOS DE AuNP/PS-b-P2VP RETICULADOS .....	71
4.10.11	<b>Estudo do tempo de exposição dos filmes finos ao agente reticulante</b> .....	<b>72</b>
4.10.2	<b>Filmes finos de AuNPs/PS-b-P2VP reconstruídos em água e reticulados</b> .....	<b>73</b>
4.10.3	<b>Filmes finos de AuNPs/PS-b-P2VP reconstruídos em etanol e reticulados</b> ....	<b>76</b>
4.10.4	<b>Filmes finos de AuNPs/PS-b-P2VP reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno e reticulados</b> .....	<b>78</b>
4.10.5	<b>Filmes finos de AuNPs/PS-b-P2VP reconstruídos termicamente e reticulados</b> .....	<b>81</b>
4.11	<b>AVALIAÇÃO DO AUNP/PS<sub>1250</sub>-B-P2VP<sub>1285</sub> COMO SUBSTRATO SERS REUTILIZÁVEL</b> .....	<b>83</b>
4.11.1	<b>Avaliação da reutilização do substrato SERS AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> usando o corante azul do Nilo como molécula prova</b> .....	<b>83</b>
4.11.2	<b>Avaliação da reutilização do substrato SERS AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> usando o corante rodamina 6G como molécula prova</b> .....	<b>90</b>
4.12	<b>DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR UTILIZANDO NANOCOMPÓSITOS DE AUNPS/PS-B-P2VP</b> .....	<b>94</b>
4.12.1	<b>Preparação do Biossensor</b> .....	<b>94</b>

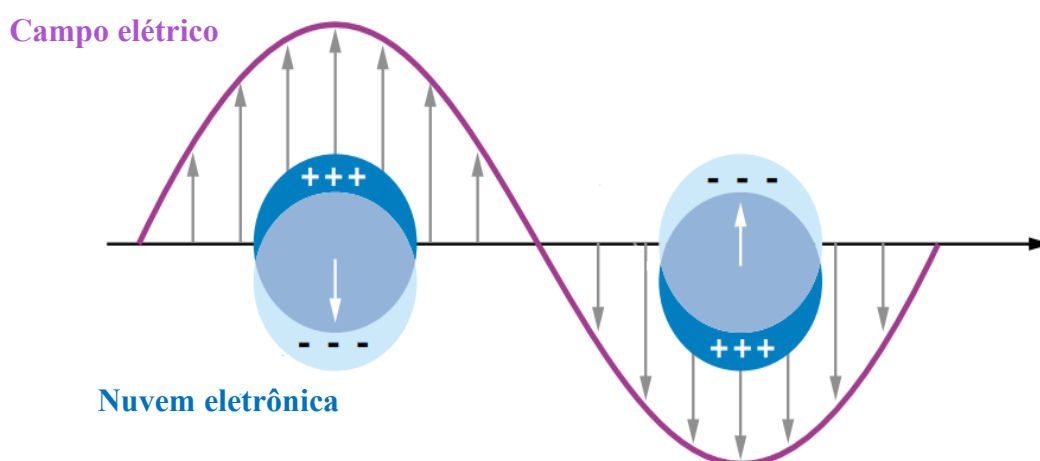
4.12.2 Detecção de diferentes concentrações de IgG .....	100
4.12.3 Ensaio de seletividade .....	102
4.12.4 Detecção de ATP utilizando o nanocompósito de AuNP/PS <sub>1250</sub> -b-P2VP <sub>1285</sub> .....	103
4.13 CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO DE <i>DIP-COATING</i> .....	105
4.13.1 Operação do equipamento .....	105
4.13.2 Preparação de filmes finos <i>layer-by-layer</i> de AuNP e PS-b-P2VP .....	105
5 CONCLUSÃO .....	109
PERSPECTIVAS.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112
ANEXO A.....	120
ANEXO B - Código fonte.....	122
ANEXO C – Artigos publicados.....	125

## 1 INTRODUÇÃO

A ciência que estuda a fabricação, caracterização e utilização de estruturas com dimensões entre 1 – 100 nm é denominada nanociência (GOESMANN; FELDMANN, 2010). Devido à suas propriedades ópticas, eletrônicas e magnéticas singulares em comparação com átomos isolados ou ao material *bulk* (grande escala), as nanopartículas (NPs) de metais nobres, como ouro e prata têm sido extensivamente estudadas e possuem diversas aplicações, tais como em sensores, catálise, dispositivos eletrônicos, entre outras.

Uma propriedade importante das nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) é a absorção intensa da luz na região do ultravioleta-visível (UV-VIS). A origem desse fenômeno está relacionada à oscilação coerente dos elétrons de condução induzida pela interação com a radiação eletromagnética. Quando essa oscilação atinge a condição de ressonância, esse fenômeno é denominado ressonância de plasmon superfície localizado (*Localized Surface Plasmon Resonance* – LSPR). No caso em que as dimensões das NPs são menores do que o comprimento de onda da luz incidente, temos a intensificação do campo elétrico local como demonstrado na Figura 1 (LE RU; ETCHEGOIN, 2009; WILLETS; VAN DUYNE, 2007).

Figura 1 - Esquema do fenômeno de LSPR.

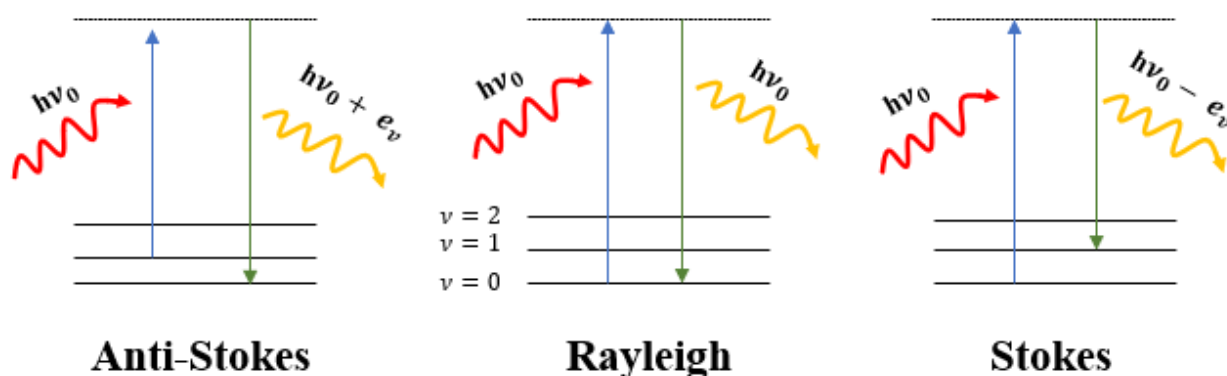


Fonte: Adaptado de WILLETS; VAN DUYNE (2007).

## 1.1 ESPALHAMENTO RAMAN E ESPALHAMENTO RAMAN INTENSIFICADO POR SUPERFÍCIE

Uma aplicação do LSPR é na intensificação do sinal Raman de analitos próximos à superfície das NPs. O efeito Raman consiste no espalhamento inelástico da luz monocromática pela matéria, sendo a atividade relacionada à variação de momento de dipolo induzido,  $\vec{P} = \alpha \cdot \vec{E}$ , onde  $\alpha$  corresponde à polarizabilidade, ou seja, a medida da deformação da nuvem eletrônica e  $E$  é o campo elétrico incidente. Quando um fóton de luz interage com uma molécula, essa interação pode resultar em diferentes tipos de espalhamento. O espalhamento pode ser elástico, conhecido como espalhamento Rayleigh, ou inelástico, que ser classificado como espalhamento Raman Stokes ou anti-Stokes. No espalhamento Stokes o fóton de energia  $h\nu_0$  colide com uma molécula em seu estado fundamental. A molécula é então excitada para um estado virtual e rapidamente decai para um estado vibracional de energia  $e_v$ , o fóton espalhado possui energia menor do que a do fóton incidente, ou seja,  $h\nu_0 - e_v$ . Por outro lado, no espalhamento anti-Stokes, a molécula já está em um estado excitado e, após interagir com o fóton, decai para o nível fundamental. Nesse caso, a energia do fóton espalhado é igual a  $h\nu_0 + e_v$ . Os mecanismos de espalhamento estão ilustrados na Figura 2.

Figura 2 - Espalhamento elástico (Rayleigh) e inelástico (Stokes e anti-Stokes).



Fonte: Elaborado pela autora.

O espalhamento Raman é empregado tanto em análises qualitativas quanto quantitativas, fornecendo informações como determinação dos componentes presentes na amostra e suas concentrações. No entanto, como este é um fenômeno de baixa intensidade devido à sua baixa seção de choque, torna-se necessário recorrer a mecanismos capazes de



intensificar o sinal Raman. Um destes processos de intensificação é o efeito de espalhamento intensificado por superfície (*Surface Enhanced Raman Scattering* - SERS) (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

O efeito SERS foi inicialmente observado em 1973 por Fleischmann, durante seus estudos sobre interface/solução. Em suas experiências, ele obteve um espectro da piridina adsorvida em um eletrodo de prata, e notou uma intensificação significativa do sinal Raman com uma relação sinal/ruído alta (FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974). Geralmente, o efeito SERS leva a uma alta intensificação do sinal, da ordem de  $10^5$  a  $10^6$ , em relação ao observado no espalhamento Raman ordinário. Dessa forma, foram desenvolvidos dois mecanismos para descrever esse efeito: o mecanismo eletromagnético e o mecanismo químico. O fator de intensificação uma combinação desses mecanismos (STILES et al., 2008).

O **mecanismo eletromagnético** para o efeito SERS é atribuído ao fenômeno de LSPR. Assim, quando uma nanopartícula metálica esférica está imersa em um meio de índice de refração  $\varepsilon_0$  e é irradiada por um campo eletromagnético do laser com intensidade  $E_0$ , temos que campo elétrico que se propaga sobre a superfície da partícula pode ser descrito pela expressão derivada por Mie em 1908 (Equação 1) (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

$$E = \frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} E_0 \quad \text{Equação 1}$$

Para maximizar o campo elétrico, é desejável que o denominador da Equação 1 seja o mais próximo possível de zero, o que ocorre quando  $\varepsilon(\omega) = -2\varepsilon_m$ . No caso de partículas metálicas, essa condição de ressonância é alcançada quando a parte imaginária de  $\varepsilon(\omega)$  é aproximadamente zero e a parte real é  $-2\varepsilon_m$ . Essa condição de ressonância é responsável pela amplificação do sinal Raman no efeito SERS (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

Considerando os campos elétricos das radiações incidente ( $E_0$ ) e espalhada ( $E_s$ ), as frequências da radiação excitante ( $\nu_0$ ) e do modo vibracional ( $\nu_k$ ), e os componentes do tensor polarizabilidade de transição para o modo  $k^2$  ( $\alpha_{i,j}$ ), em relação aos eixos cartesianos x e y, o valor da intensificação do campo elétrico local para um modo vibracional k pode ser dado pela Equação 2 (LE RU; ETCHEGOIN, 2009):

$$I_k \propto |E_0|^2 \cdot |E_s|^2 (\bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_k)^4 \sum_{i,j} \bar{\alpha}_{i,j} \quad \text{Equação 2}$$

Pela Equação 2 temos que o aumento da intensidade SERS é dependente da quarta potência do campo que se propaga sobre a superfície da partícula. Esse campo é afetado pelo

tamanho, forma e composição das nanopartículas metálicas utilizadas como substrato para o efeito SERS.

O **mecanismo químico** produz outro efeito que também contribui para a intensificação do sinal Raman de moléculas adsorvidas em superfícies metálicas. Este efeito corresponde, de acordo com Le Ru e Etchegoin, a qualquer modificação do tensor de polarizabilidade Raman após a interação molécula-metal. Essa interação pode ser classificada em adsorção química, quando ocorre uma drástica variação no volume eletrônico, formando o chamado complexo de superfície ou adsorção física na qual não ocorre ligação química, porém também há uma distorção no volume eletrônico (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Além disso, o mecanismo químico é responsável por explicar as mudanças espectrais observadas por meio do processo de transferência de carga. Este é resultante da transferência de um elétron do nível de Fermi do metal para o nível desocupado mais baixo da molécula (LUMO) (metal → molécula) ou vice-versa, sendo que serão observadas as intensificações de certos modos vibracionais relacionados com esta ressonância (YAMAMOTO; ITOH, 2016).

Quando a molécula está em pré-ressonância com a linha de excitação usada, ou seja, quando a radiação excitante está na faixa de uma banda eletrônica específica, é possível observar o efeito Raman Ressonante. Nesse fenômeno, certos modos vibracionais relacionados à absorção são intensificados. Quando combinamos os efeitos Raman Ressonante e o efeito SERS, observamos o que é conhecido como efeito SERRS (SERRS - do inglês *Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy*). A combinação desses efeitos resulta em um aumento do sinal, o que permite a detecção de concentrações da ordem de nanomolar (AROCA, 1993).

A teoria de Mie é aplicável a partículas isoladas com diâmetros da ordem de poucos nanômetros. No entanto, quando lidamos com partículas acopladas, ou seja, quando a distância,  $d$ , entre as partículas é da ordem de  $d \leq 5R$ , sendo  $R$  o raio da partícula e  $d$  a distância entre os centros das partículas, outros fatores devem ser levados em consideração (GHOSH; PAL, 2007). Nesses casos, é possível observar no espectro UV-VIS um deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda maiores e um alargamento da banda (DEMYDOV et al., 2021). Em relação à espectroscopia SERS, tem-se que a diminuição da distância interpartículas leva à formação de regiões de maior intensificação do sinal Raman, conhecidos como *hot spots* (SHIOHARA; WANG; LIZ-MARZÁN, 2014).

## 1.2 PREPARAÇÃO DE SUBSTRATOS SERS

Embora os sistemas coloidais estejam sendo intensamente investigados como plataformas para aplicações em sensores LSPR ou SERS, persiste a demanda pelo desenvolvimento de substratos que sejam estáveis em longo prazo e reproduzíveis, uma vez que soluções coloidais tendem a se agregar ao longo do tempo, devido à alta energia superficial das NPs. Nesse sentido, pesquisadores têm empregado matrizes poliméricas como substratos para síntese ou imobilização de NPs. Junisu e Sun demonstraram a fabricação de uma rede 3D de nanoestruturas de ouro interconectadas para aplicação como substrato SERS. Como matriz para a síntese *in situ* e a estabilização das nanoestruturas foram empregados filmes porosos de poliestireno-*b*-poli(2-vinilpiridina) (PS-*b*-P2VP). Os pesquisadores observaram um fator de intensificação superior a  $10^9$  e limite de detecção do corante Rodamina 6G de  $5 \text{ nmol L}^{-1}$  (JUNISU; SUN, 2020).

### 1.2.1 Produção de filmes finos por spin coating e dip coating

Dentre as diversas técnicas desenvolvidas para a síntese filmes finos poliméricos, iremos destacar o uso das técnicas de *spin-coating* e *dip-coating* (JENCZYK et al., 2019) (OGAWA et al., 2016)(ROLAND et al., 2012). A técnica de *spin-coating* é baseada na força centrípeta para a formação dos filmes finos. Assim, uma pequena quantidade de material é depositada sobre o substrato que é rotacionado a altas velocidades, formando uma camada fina e uniforme do material (Figura 3a). A espessura do filme gerado dependerá da velocidade e tempo de rotação e das propriedades da solução como viscosidade, taxa de secagem, tensão superficial, entre outras (TAYLOR, 2001). A equação 3 ilustra a dependência da espessura com os parâmetros mencionados (MISHRA; BHATT; BAJPAI, 2019).

$$h = \left(1 - \frac{\rho_A}{\rho_{A0}}\right) \times \left(\frac{3\eta m}{2\rho_{A0}\omega^2}\right)^{1/3} \quad \text{Equação 3}$$

Onde  $h$  é a espessura,  $\rho_A$  é a densidade da solução,  $\eta$  é a viscosidade da solução,  $m$  é a taxa de evaporação e  $\omega$  é a velocidade angular (MISHRA; BHATT; BAJPAI, 2019).

As vantagens de utilizar a técnica de *spin-coating* são a formação de filmes finos e uniformes de maneira rápida. No entanto, uma desvantagem dessa técnica é a dificuldade de deposição em substratos de tamanho grande. Isso ocorre porque, à medida que o tamanho do

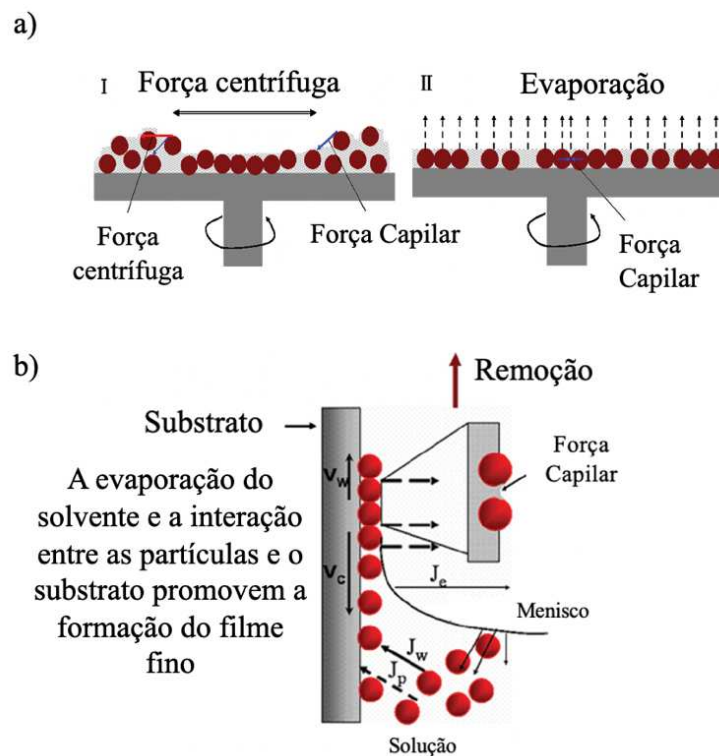
substrato aumenta, torna-se mais difícil atingir altas velocidades de rotação necessárias para obter a uniformidade desejada no filme (YILBAS; AL-SHARAFI; ALI, 2019).

Já na técnica de *dip-coating*, o substrato é imerso e removido de uma solução contendo o material a uma velocidade constante. No processo de *dip-coating*, o material se auto-organiza durante o processo de remoção do substrato da solução (Figura 3b). Além disso, temos que a espessura do filme dependerá das propriedades do material a ser depositado e da velocidade de remoção do substrato da solução (WANG; ZHOU, 2010). A espessura de um filme fino ( $h$ ) produzido por *dip-coating* pode ser estimada utilizando a equação proposta por Landau-Levich (Equação 4).

$$h = c \times \frac{(\eta U)^{2/3}}{\gamma^{1/6}(\rho g)^{1/2}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde  $c$  é constante (para líquidos Newtonianos  $c = 0,944$ ),  $\eta$  é a viscosidade da solução,  $U$  é a velocidade de remoção,  $\gamma$  é a tensão superficial do líquido em relação ao ar e  $\rho$  é a densidade do líquido (PUETZ; AEGERTER, 2004).

Figura 3 - Processo de formação de filme fino por (a) *spin-coating* e por (b) *dip-coating*.

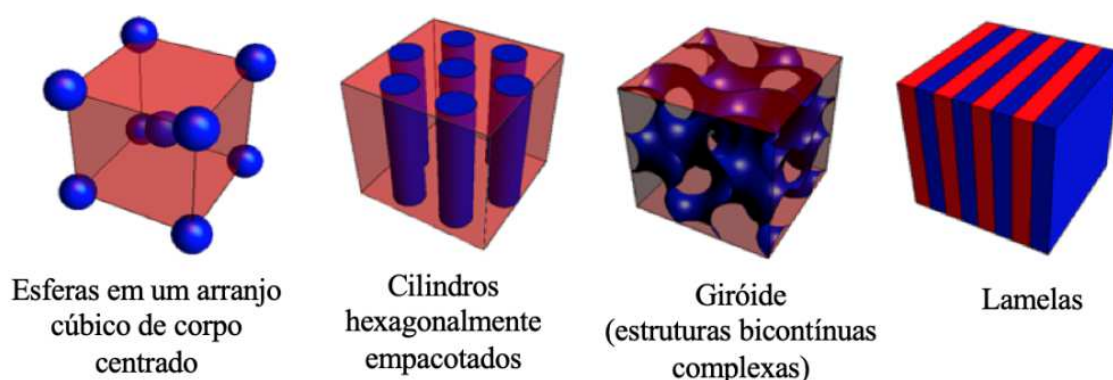


Fonte: Adaptado de WANG, ZHOU (2010).

### 1.2.2 Matrizes poliméricas: Poliestireno-*b*-poli(2-vinilpiridina)

Dentre os polímeros que podem ser utilizados na síntese ou imobilização de NPs, destacam-se os copolímeros em dibloco (*block copolymers* - BCPs) anfifílicos, que são compostos por dois blocos de polímero com polaridades distintas conectados covalentemente (BATES; FREDRICKSON, 1999; LAZZARI; TORNEIRO, 2020). Estudos têm demonstrado que filme finos desse tipo de polímero são capazes de se auto-organizar em diferentes morfologias em escala nano/micrométrica, formando estruturas estáveis como esferas, cilindros hexagonalmente empacotados, lamelas e estruturas bicontínuas complexas (giróide) (Figura 4) (MATYIAZEWSKI; MÖLLER, 2013).

Figura 4 - Principais morfologias de filmes finos de di-BC anfifílicos.



Fonte: Adaptado de LODGE (2003).

Essa organização que ocorre devido à baixa afinidade química entre os blocos que constituem esse tipo de polímero é governado pela Energia de Gibbs de mistura ( $\Delta G_{\text{mist}}$ ). A equação 5 traz a dependência de  $\Delta G_{\text{mist}}$  com as mudanças de entalpia ( $\Delta H_{\text{mist}}$ ) e entropia ( $\Delta S_{\text{mist}}$ ), a temperatura constante (HAMLEY, 1998).

$$dG_{\text{mist}} = dH_{\text{mist}} + TdS_{\text{mist}} \quad \text{Equação 5}$$

O processo de mistura entre macromoléculas é endotérmico, o que resulta em um valor positivo para  $\Delta H_{\text{mist}}$ , favorecendo a separação de fases. Dessa maneira, o  $\Delta S_{\text{mist}}$  é o termo responsável por aumentar a liberdade de movimento das macromoléculas e promover a miscibilidade. Porém, no caso de materiais poliméricos, o aumento na entropia não é tão

significativo, o que resulta em um valor desfavorável para  $\Delta G_{\text{mist}}$ . Consequentemente, ocorre a formação de microdomínios (KUPERKAR et al., 2022).

Além disso, tem-se que a morfologia final dependerá de certos parâmetros como a massa molar do copolímero e de cada bloco, espessura do filme e condições de cura (MATYIAZEWSKI; MÖLLER, 2013). Os parâmetros que governam a simetria de equilíbrio que será formada em filmes finos de di-BC anfífilicos são o grau de polimerização ( $N$ ), o parâmetro de Flory-Huggins ( $\chi$ ) e a fração molar do copolímero dada pela Equação 6.

$$\varphi_A + \varphi_B = 1 \quad \text{Equação 6}$$

Onde  $\varphi_A$  é a fração molar do bloco A e  $\varphi_B$  é a fração molar do bloco B.

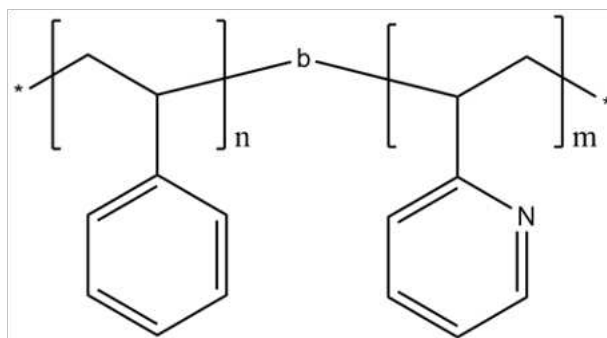
O valor de  $N$  é proporcional ao peso molecular do polímero, assim, quanto maior for o peso molecular, menor será a solubilidade do polímero. Além disso, temos o parâmetro de Flory-Huggins ( $\chi$ ) que é utilizado para medir a incompatibilidade entre os blocos constituintes de um copolímero. Quanto maior for esse parâmetro, maior será a tendência de segregação entre os blocos. Assim, o produto  $N\chi$  determina o grau de segregação. Quando  $N\chi \leq 10$ , o efeito entrópico prevalece e o sistema se encontra em uma condição desordenada. Por outro lado, quando  $N\chi \geq 10$ , o efeito entálpico se torna dominante e ocorre a formação de microfases, onde os blocos se separam em regiões distintas com composições diferentes (DENG et al., 2003; KIM et al., 2010; SHI, 2021).

Ademais, o parâmetro de Flory-Huggins ( $\chi$ ) tem uma dependência com a temperatura, sendo inversamente proporcional a ela ( $\chi \propto 1/T$ ). Isso significa que, em um processo de resfriamento de um copolímero, a separação de fases ocorre inicialmente em temperaturas mais altas. À medida que a temperatura diminui, a incompatibilidade entre os blocos aumenta e a segregação é favorecida (DENG et al., 2003). Por fim, é importante mencionar que a variação das frações dos blocos constituintes de um copolímero também influencia a morfologia resultante. Alterações nas proporções dos blocos podem levar a mudanças na organização e na estrutura das fases segregadas, resultando em diferentes morfologias finais (SHI, 2021).

Dentre os copolímeros em bloco, destaca-se o poliestireno-*b*-poli(2-vinilpiridina) (Figura 5). Por exemplo, Liu e colaboradores demonstraram o uso de filmes finos de PS-*b*-P2VP reconstruídos em atmosfera de tolueno/THF como matriz para adsorção de AuNPs, resultando em nanocompósitos AuNPs/PS-*b*-P2VP. Devido à diferença de polaridade entre os blocos desse copolímero, os microdomínios hidrofílicos (P2VP) atuam como sítios seletivos para a adsorção de NPs de ouro estabilizadas com citrato através de interações eletrostáticas.

Além disso, os autores demonstraram que o processo de reticulação do filme polimérico é importante para impedir a reconstrução indesejada do filme fino de PS-*b*-P2VP durante o processo de adsorção das AuNPs, obtendo arranjos de NPs altamente organizados (LIU et al., 2016).

Figura 5 - Estrutura química do poliestireno-*b*-poli(2-vinilpiridina).



Fonte: Elaborado pela autora.

### 1.3 SUBSTRATOS REUTILIZÁVEIS

Com a descoberta do efeito SERS, vários estudos se dedicaram a compreender e otimizar a sensibilidade dos espectrômetros. A partir do desenvolvimento da técnica, o foco tornou-se o desenvolvimento de nanoestruturas que fossem reprodutíveis, seletivas e estáveis ao longo do tempo. Nos últimos anos, observou-se um crescente interesse na fabricação de substratos SERS que possuam não apenas essas características, mas também a capacidade de serem reutilizados através da degradação fotocatalítica. A reutilização dos substratos SERS é de grande relevância para aplicações práticas, uma vez que permite uma análise mais econômica e sustentável (PRAKASH, 2019).

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de intensificar a sensibilidade e seletividade dos substratos SERS (BIAN et al., 2015; LIN et al., 2012; WU et al., 2014; ZHU et al., 2011). Embora tenham sido feitos progressos significativos nesse sentido, a obtenção de substratos SERS reprodutíveis e reutilizáveis ainda é um desafio. Nesse contexto, nanocompósitos com propriedades fotocatalíticas têm recebido uma atenção considerável dos pesquisadores (JIANG et al., 2017; LIU et al., 2023; SHAFI et al., 2022; XIE et al., 2021). Esses nanocompósitos possuem uma dupla funcionalidade, ou seja, são capazes de detectar e degradar os analitos, regenerando o substrato para reutilização (PRAKASH, 2019).

A maior parte dos trabalhos publicados na área de fotocatalise utilizam semicondutores como materiais fotocatalíticos. Isso ocorre devido à capacidade dos semicondutores de absorver luz e gerar pares de elétrons-buracos, que podem iniciar reações de oxidação e redução (CHRISTOPHER et al., 2012). Porém, estudos demonstraram que certas limitações no uso de semicondutores em reações fotocatalisadas podem ser superadas empregando compósitos de semicondutores e nanopartículas metálicas (LOPES et al., 2022; ZHU; ZHOU, 2019). Sinha e colaboradores demonstraram a reprodutibilidade e reutilização dos substratos SERS baseados em nanobastões de óxido de zinco recobertos com ouro. A propriedade fotocatalítica dos nanobastões de óxido de zinco, ativada pela luz UV, permitiu a degradação dos analitos presentes na amostra, enquanto o ouro recobrendo a superfície dos nanobastões fornecia a amplificação de sinal necessária para a detecção SERS. No estudo mencionado, foi demonstrado que, mesmo após passar por dez processos de limpeza induzidos por luz UV, o sinal SERS obtido manteve-se reprodutível. Além disso, o limite de detecção para o analito azul de metileno foi de  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  (SINHA; DEPERO; ALESSANDRI, 2011).

Recentemente, estudos têm demonstrado que o uso de semicondutores não é mais considerado um pré-requisito para as reações fotocatalíticas. Em vez disso, foi demonstrado que é possível utilizar apenas o fenômeno de LSPR em nanopartículas de Au, Ag e Cu para controlar e acelerar reações químicas em condições mais brandas (ARAUJO et al., 2019; ZHAO et al., 2022). Por exemplo, Lopes e colaboradores demonstraram o uso de espécies reativas de oxigênio geradas por catálise plasmônica na reação regioseletiva de descarboxilação de moléculas de ácido mercaptobenzóico adsorvidas na superfície das nanopartículas (DOS SANTOS LOPES et al., 2022). Por isso, neste trabalho, utilizamos somente a radiação UV para a remoção da molécula prova adsorvida nas AuNPs para a reutilização de substratos SERS.

#### 1.4 BIOSSENSORES

Os biossensores são dispositivos analíticos projetados para converter uma resposta química, biológica ou bioquímica em um sinal mensurável. O princípio fundamental por trás dos biossensores é a interação seletiva entre o elemento receptor e a substância-alvo, que desencadeia uma resposta que pode ser convertida em um sinal elétrico detectável. Esse sinal elétrico é então processado e interpretado por um instrumento, permitindo a quantificação ou detecção qualitativa do analito (MCNAMARA; TOFAIL, 2017). Dessa maneira, o desenvolvimento de biossensores que oferecem uma detecção rápida, precisa e seletiva de substâncias-alvo tem despertado o interesse de pesquisadores em várias áreas devido à sua



importância em diagnósticos clínicos, detecção de poluentes no meio ambiente e identificação de drogas ilícitas (ANZAR et al., 2022; DARWISH et al., 2018; HAES et al., 2005; HUANG et al., 2023; JEBELLI et al., 2020; KRAMPA et al., 2020; SIKARWAR et al., 2014).

#### 1.4.1 Biossensores baseados em LSPR

Dentre os diversos tipos de metodologias utilizadas para detecção de biomoléculas, destaca-se os biossensores baseados no LSPR, os quais têm sido intensamente estudados devido à sua capacidade de detectar diferentes analitos em concentrações muito baixas (na faixa de nanomolar) de maneira rápida, sensível e seletiva (USMAN et al., 2023). Além disso, ao funcionalizar a superfície das nanopartículas com diferentes receptores, como ácidos nucleicos, glicoproteínas, anticorpos e aptâmeros, é possível criar sensores altamente seletivos para uma ampla gama de biomoléculas (LY; PARK, 2020; MAURIZ, 2020; SHU et al., 2017; VADLAMANI et al., 2020).

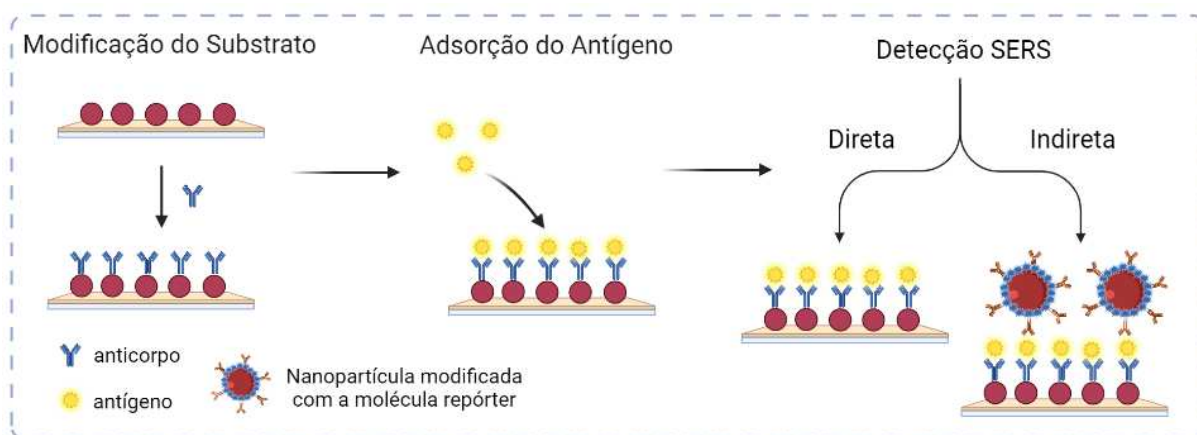
A frequência do LSPR depende fortemente de características intrínsecas das nanopartículas como forma, tamanho e de propriedades extrínsecas como a constante dielétrica do meio (WILLETS; VAN DUYNE, 2007). Estudos realizados por Ghosh e colaboradores demonstraram que o máximo da banda de absorção de AuNPs variam entre 520 e 550 nm, uma variação influenciada pelo índice de refração e a natureza química do solvente empregado. Além disso, os autores observaram o deslocamento do máximo de absorção para maiores comprimentos de onda com o aumento do índice de refração do solvente (GHOSH et al., 2004). Muitas pesquisas envolvendo espectroscopia LSPR utilizam a sensibilidade dos plasmon em relação a mudanças na constante dielétrica do meio no desenvolvimento de biossensores, uma vez que qualquer mudança no índice de refração pela formação de uma ligação entre a nanopartícula e um analito pode ser quantificada por mudanças no sinal LSPR (NATH; CHILKOTI, 2002, 2004; STEWART et al., 2008).

Funari e colaboradores desenvolveram um sensor opto-microfluídico com nanospikes de ouro fabricados por eletrodeposição específico para a proteína S do SARS-COV-2. Após a funcionalização das nanoestruturas com a proteína S, os pesquisadores foram capazes de detectar concentrações de até 0,08 ng L<sup>-1</sup> de anticorpos específicos para essa proteína. A detecção quantitativa foi realizada por meio do deslocamento do máximo da banda LSPR com a mudança do índice de refração local devido à formação da ligação específica antígeno/anticorpo (FUNARI; CHU; SHEN, 2020).

### 1.4.2 Biossensores SERS

Um imunoenensaio baseado na espectroscopia SERS envolve a funcionalização do substrato para a captura do analito, seguida por uma análise Raman que pode ser conduzida de maneira direta (*label-free*) ou indireta, como apresentado na Figura 6. Na detecção indireta, as nanoestruturas são modificadas com uma molécula repórter que possui um sinal SERS intenso e bem conhecido. Quando essas nanoestruturas modificadas entram em contato com o analito, ocorre a intensificação do sinal da molécula repórter, o que permite a detecção indireta do analito (PORTER et al., 2008). Já nas medidas diretas, o sinal do analito adsorvido ou imobilizado seletivamente sobre as nanopartículas metálicas é intensificado. Esse método é considerado mais simples quando comparado com a metodologia indireta, pois não necessita do uso de moléculas repórteres. Além disso, permite identificar e caracterizar espectroscopicamente o analito (PILOT et al., 2019; SAVIÑON-FLORES et al., 2021).

Figura 6 – Esquema de detecção de biomoléculas por SERS.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Uma das dificuldades encontradas no desenvolvimento de biossensores baseados na espectroscopia SERS é a fabricação de biossensores que sejam estáveis a longo prazo, reprodutíveis, sensíveis e seletivos (FAN; ANDRADE; BROLO, 2020; TRIPP; DLUHY; ZHAO, 2008). Assim, pesquisadores têm desenvolvido sensores “*on-chip*”, por meio da imobilização ou síntese *in situ* de nanopartículas metálicas em substratos sólidos (LI; CUSHING; WU, 2015) (AUSTIN SUTHANTHIRARAJ; SEN, 2019) (PEIXOTO; SANTOS; ANDRADE, 2019). Shanmukh e colaboradores realizaram um estudo onde foi demonstrado

que é possível distinguir diferentes tipos vírus, como, por exemplo, o adenovírus, rinovírus e o vírus do HIV, a partir de diferenças espectrais observadas na detecção direta utilizando substratos de nanobastões de prata fabricados por deposição em ângulo oblíquo. Assim, o estudo demonstrou a possibilidade de detectar diferentes tipos de vírus de forma direta, rápida e seletiva por meio da espectroscopia SERS (SHANMUKH et al., 2006).

Além disso, matrizes poliméricas têm se mostrado boas candidatas para síntese e imobilização de nanopartículas metálicas na fabricação de sensores (CLUKAY et al., 2014) (ZHU; MASSON; BAZUIN, 2019) (ZHU; MASSON; BAZUIN, 2020). No estudo conduzido por Li e colaboradores, foi apresentado o uso de filmes de AgNPs/nanocristais de celulose/óxido de grafeno para detecção de câncer de cólon por análise SERS direta. O nanofilme sintetizado apresentou uma sensibilidade satisfatória para o corante azul do Nilo ( $LD = 30 \text{ nmol L}^{-1}$ ). Ao empregar *machine learning*, o estudo alcançou uma precisão de 84,1% na diferenciação entre células cancerígenas de cólon e células saudáveis, demonstrando o potencial desse nanocompósito na detecção desse tipo de câncer (LI et al., 2023).

De acordo com os estudos realizados na área, os substratos SERS baseados em nanocompósitos de nanoestruturas metálicas e polímeros têm demonstrado vantagens significativas em relação aos sensores que utilizam apenas soluções coloidais. Esses substratos oferecem uma melhor sensibilidade, tornando possível a detecção de baixas concentrações de analitos, além de apresentarem alta seletividade para espécies específicas. Além disso, esses substratos são mais reprodutíveis e mais estáveis ao longo do tempo, o que é crucial para aplicações práticas em análises químicas e biológicas. Essas características tornam os substratos SERS baseados em nanocompósitos formados por nanopartículas e polímero uma escolha promissora para o desenvolvimento de sensores eficientes (USMAN et al., 2023).

Assim, este trabalho apresenta o desenvolvimento de um sensor SERS direto e *label-free* para a detecção de uma imunoglobulina G (IgG) modelo com base em um substrato SERS estável e reproduzível. IgG é o anticorpo mais comum em seres humanos, e sua concentração em adultos saudáveis varia de 7 a 18  $\text{mg mL}^{-1}$ , dependendo da resposta a diferentes patógenos, como vírus e bactérias (QU et al., 2021). A fabricação e a detecção de várias concentrações de IgG (de 1 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram alcançadas por meio da funcionalização passo a passo das AuNPs/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> com anti-IgG e da aplicação de espectroscopia SERS e análise de componentes principais (PCA). Além disso, para verificar a seletividade do biossensor, uma solução padrão de IgM foi usada como controle. Para demonstrar que a abordagem relatada aqui pode ser adaptada para detectar diferentes tipos de analitos, o sistema AuNPs/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> também foi modificado com anti-ATP (anti-adenosina trifosfato), e um ensaio para a

detecção direta de ATP, um biomarcador importante para Alzheimer (PATRO et al., 2021), foi desenvolvido.

## 2 OBJETIVOS

Nas seções 2.1 e 2.2 são apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos desse trabalho, respectivamente.

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral desse trabalho foi produzir filmes poliméricos contendo NPs metálicas com organização em escala micro/nanométrica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Produzir filmes finos de AuNPs adsorvidas em PS-*b*-P2VP;
- b) Investigar a influência da massa molecular do PS-*b*-P2VP na organização, morfologia e propriedades ópticas dos filmes contendo AuNPs;
- c) Estudar a reorganização dos filmes de PS-*b*-P2VP com diferentes tratamentos;
- d) Analisar como os diferentes tratamentos e o tempo de imersão em solução coloidal de ouro influenciam na reorganização do PS-*b*-P2VP e na adsorção das AuNPs;
- e) Verificar a atividade SERS das AuNPs sobre os filmes de PS-*b*-P2VP usando o corante azul do Nilo como molécula de prova;
- f) Desenvolver um biossensor LSPR baseado na funcionalização de filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP para a detecção de antígenos;
- g) Construir um equipamento de *dip-coating*;
- h) Sintetizar filmes finos automontados de PS-*b*-P2VP com AuNP;
- i) Verificar a atividade SERS dos filmes automontados fabricados utilizando as moléculas prova azul do Nilo e rodamina 6G.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

A Tabela 1 lista todos os reagentes empregados nesse trabalho, o quais foram utilizados conforme recebidos, sem tratamento prévio.

Tabela 1 - Lista dos reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula/estrutura	MM g/mol	Teor %	Procedência
Acetona	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	58,08	99,5	Aldrich
Ácido 11-mercaptopundecanoico	HS(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CO <sub>2</sub> H	218,36	95	Aldrich
Ácido 3-mercaptopropiônico	HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	106,14	99	Aldrich
Ácido Sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98,08	95-99	Aldrich
Ácido tetracloroáurico	HAuCl <sub>4</sub>	339,79	99	Aldrich
Álcool isopropílico	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	60,10	99,7	Aldrich
Azul do Nilo	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O	353,9	85	Aldrich
Etanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	46,06	99,5	Aldrich
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> · HCl	191,70	98	Aldrich
N-Hidroxisuccinimida	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	115,09	98	Aldrich
Peróxido de hidrogênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34,02	30	Aldrich
Rodamina 6G	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl	479,01	95	Aldrich
Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92,14	99,8	Aldrich

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Tabela 2 apresenta as principais propriedades dos copolímeros utilizados nas sínteses de filmes finos.

Tabela 2 - Massa molar e índice de polidispersividade do PS-b-P2VP

Copolímero	M <sub>n</sub> (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>w</sub> (g mol <sup>-1</sup> )	(M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> )	(PS:P2VP)
(C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>154</sub> (C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N) <sub>33</sub>	19.500	20.475	1,05	154:33
(C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>281</sub> (C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N) <sub>157</sub>	66.500	72.485	1,09	281:157
(C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>389</sub> (C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N) <sub>381</sub>	80.500	88.550	1,10	389:381
(C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>1250</sub> (C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N) <sub>1285</sub>	265.000	355.500	1,30	1250:1285

Fonte: Polymer Source, Inc (Quebec, Canada).

### 3.1 TÉCNICAS E EQUIPAMENTOS

Os espectros de absorção foram obtidos no espectrômetro UV-VIS Shimadzu, modelo 1800, situado no Departamento de Química da UFJF na faixa de 300 nm a 1100 nm. Os filmes depositados em substrato de vidro foram afixados no porta amostras para a realização das medidas de UV-VIS. Os mapeamentos SERS de regiões  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  foram registrados utilizando o espectrômetro Raman dispersivo Bruker, modelo Senterra, instalado no prédio de Ciências de Materiais-ICE utilizando as linhas de excitação  $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$  e  $\lambda_0 = 633 \text{ nm}$ , duas coadições de 50 segundos e potência de 10 mW. Medidas de microscopia eletrônica foram feitas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (TEM) marca FEI, modelo Tecnai Spirit, nas condições de trabalho de 120 kV, em colaboração com o INMETRO, em Duque de Caxias, RJ sob a supervisão do Dr. Braúlio S. As medidas de microscopia de força atômica foram feitas no LNNano situado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas (SP) utilizando os equipamentos NX-10 Park Systems e Multimode8-HR Bruker sob supervisão do Dr. Carlos Alberto Rodrigues Costa.

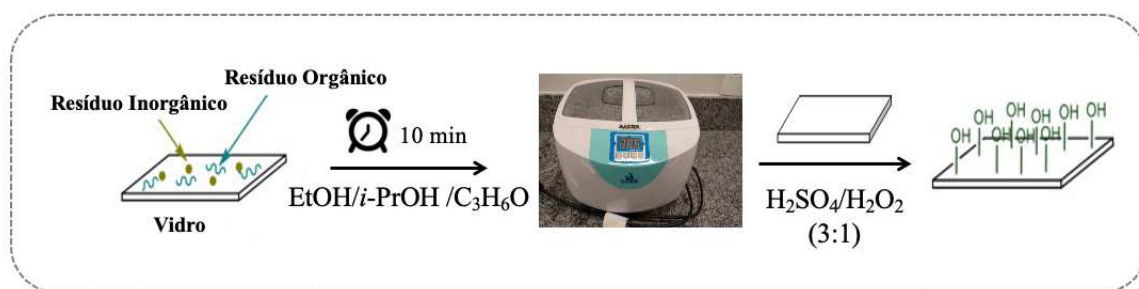
### 3.2 MÉTODOS

Nas próximas seções serão descritas as metodologias para preparação dos nanocompósitos e os procedimentos de caracterização e aplicação.

#### 3.2.1 Preparação do substrato de vidro

Os substratos de vidro ( $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ ) foram limpos utilizando-se um procedimento adaptado da literatura (HARIRCHIAN-SAEI et al., 2012). Os substratos foram limpos em banho ultrassônico com os seguintes solventes: etanol, álcool isopropílico e acetona, cada um por um período de 10 min. Em seguida, os substratos foram imersos em solução piranha ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  7:3) por 30 min, lavados vigorosamente com água deionizada e secos sob condições ambientes (Figura 7).

Figura 7 - Esquema da preparação dos slides de vidro.

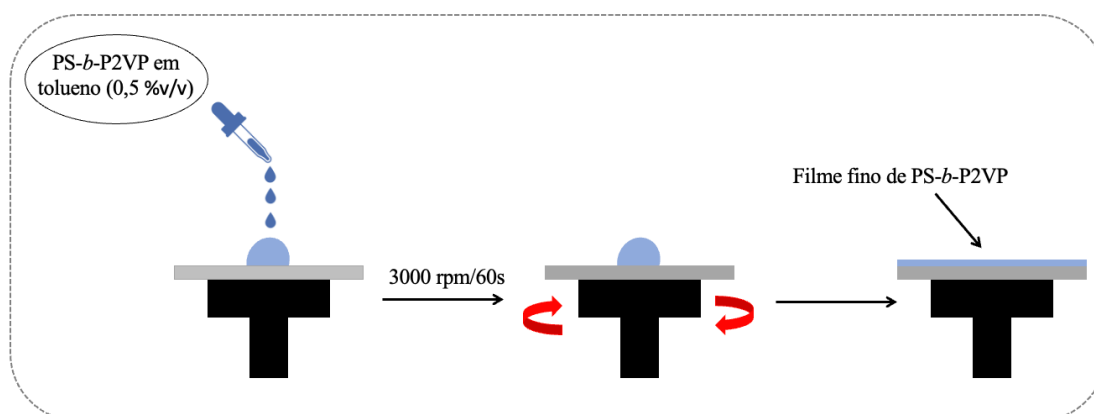


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.2.2 Preparação dos filmes finos de PS-*b*-P2VP

Primeiramente o PS-*b*-P2VP foi dissolvido em tolueno de forma a se obter uma concentração final de 0,5 % (m/v). 3 gotas dessa solução foram depositadas nos substratos de vidros previamente limpos utilizando-se o *spin coating* em 3000 rpm por 60s, como ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema para síntese dos filmes finos de PS-*b*-P2VP.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em seguida, foram utilizados os seguintes tratamentos para gerar diferentes morfologias: imersão em água por 10 min, imersão em etanol por 10 min, atmosfera de THF/tolueno (3:7) por 2 h e tratamento térmico a 150 °C por 1 h e 30 min. Filmes finos de P2VP também foram preparados para comparação.

### 3.2.3 Preparação de filmes finos de PS-*b*-P2VP reticulados

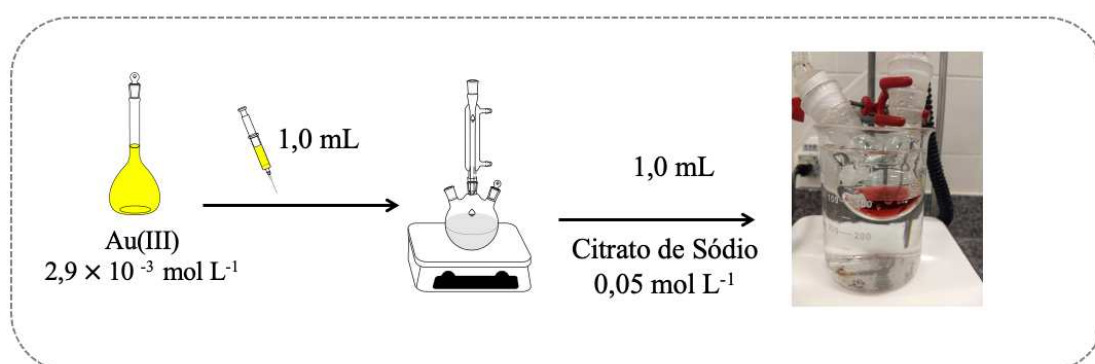


Para realizar a reticulação dos filmes finos foi empregada a metodologia proposta por Liu e colaboradores (2016). Assim, filmes preparados na seção 3.3.2 foram tratados com vapor de 1,4-diiodobutano (DIB) a 60 °C por 1 h na estufa à vácuo.

### 3.2.4 Síntese e adsorção das NPs de ouro

As AuNPs foram sintetizadas empregando a metodologia proposta por Frens (FRENS, 1973). Assim, 1,0 mL de  $\text{HAuCl}_4$  ( $2,9 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ) foi adicionado a 100 mL de água deionizada e aquecido até a ebulição. Neste momento, foi adicionado à solução 1 mL de citrato de sódio 1%. Após alguns minutos obteve-se uma solução coloidal de coloração vermelho vivo (Figura 9). O diâmetro médio das NPs de ouro foi determinado por meio da análise de 250 nanopartículas em imagens de TEM utilizando o software ImageJ.

Figura 9 - Esquema da síntese de NPs de ouro.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

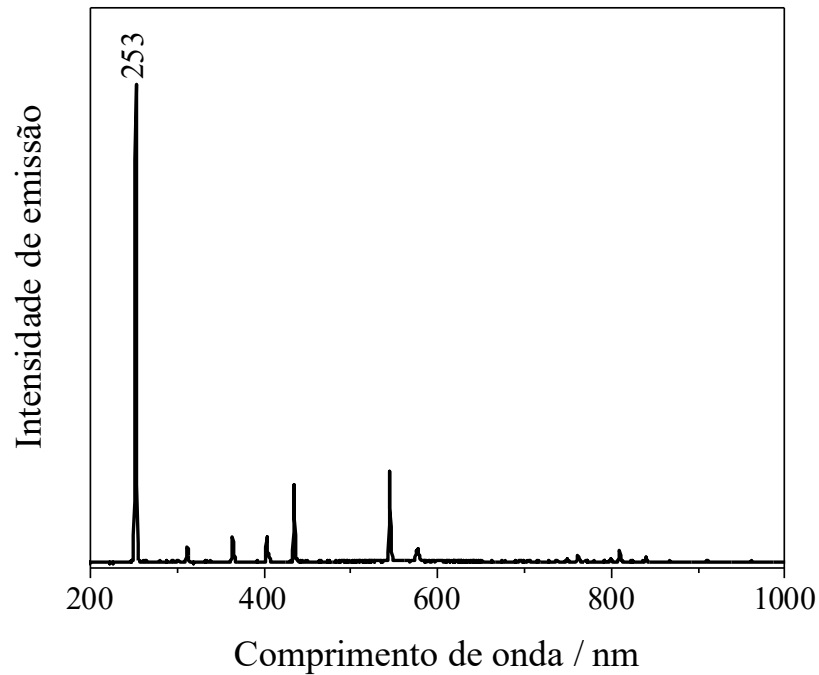
Os filmes finos preparados nas seções 3.3.2 e 3.3.3 foram imersos nessa solução coloidal de ouro, variando-se o tempo de imersão entre 1 – 6 h.

### 3.2.5 Degradação de corantes catalisada por AuNPs

O filme fino preparado na seção 3.3.4 utilizando o copolímero de  $M_w = 355.500$  foi empregado como catalisador na degradação dos corantes Azul do Nilo e Rodamina 6G. Assim, os filmes foram imersos nas soluções de corantes ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) por 12 h e posteriormente foram expostos à radiação UV ( $\lambda = 253 \text{ nm}$ ) por um período de 6 horas. A Figura 10 apresenta

o espectro de emissão da lâmpada de Hg (potência = 60 W) utilizada como fonte de radiação UV.

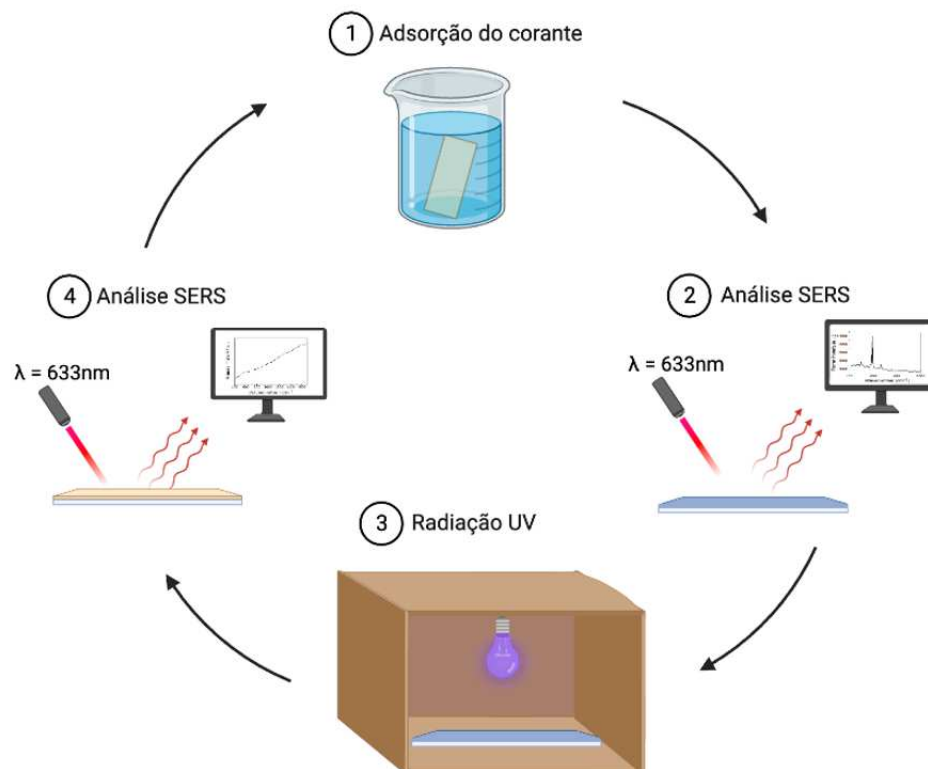
Figura 10 - Espectro de emissão da lâmpada de UV utilizada na fotodegradação.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Foram conduzidos quatro ciclos de adsorção e degradação para avaliar a possibilidade de reutilização do substrato. Após cada etapa, foram coletados espectros SERS para monitorar o processo. O esquema do procedimento é apresentado na Figura 11, ilustrando a sequência de etapas realizadas.

Figura 11 - Esquema da remoção da molécula prova utilizada no SERS através da fotocatalise plasmônica.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.2.6 Desenvolvimento do sensor para IgG

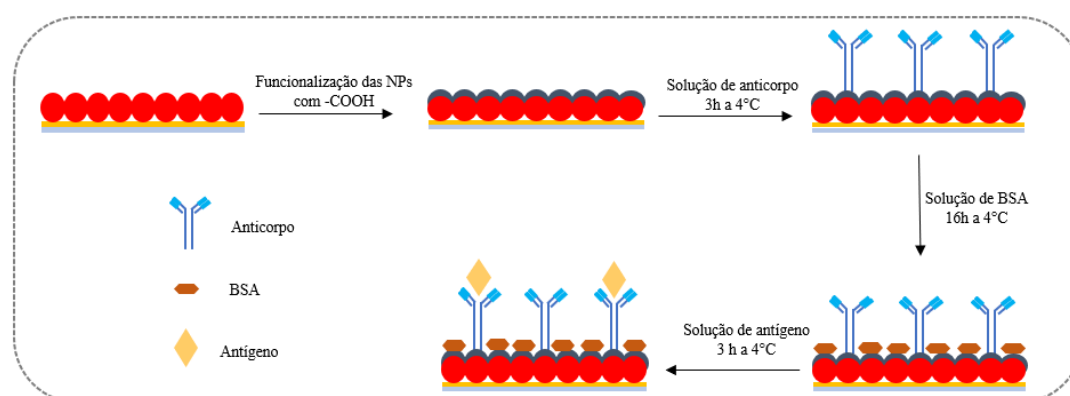
Para o desenvolvimento do biossensor foram utilizados albumina de s rum bovino (Aldrich), tampão fosfato (Aldrich), imunoglobulina G, anti-imunoglobulina G, imunoglobulina M, trifosfato de adenosina, anti-trifosfato de adenosina (MyBiosource).

#### 3.2.6.1 Funcionaliza o do substrato e detec o do antígeno IgG

O sensor LSPR foi preparado seguindo o procedimento proposto por Funari e colaboradores (FUNARI; CHU; SHEN, 2020). O esquema da funcionaliza o   mostrado na Figura 12. Inicialmente, as AuNPs foram funcionalizadas pela imersão do substrato em uma soluço de 1:9 de 1,0 mmol/L de ácido 11-mercaptoundecan ico (11-MUA) e ácido 3-mercaptopropion ico (MPA) em etanol por 18 horas   temperatura ambiente. O excesso de 11-

MUA foi removido através da lavagem do substrato com etanol. Em seguida, o grupo carboxílico terminal foi ativado imergindo o substrato em uma solução 1:1 de 0,1 mol/L de N-etil N-(3 dietilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 0,1 mol/L de N-hidroxisuccinimida (NHS) por 3 horas à temperatura ambiente. O substrato foi lavado com tampão fosfato (PBS) de pH = 7,4 para remover o excesso de EDC e NHS. Posteriormente, o substrato foi exposto a diferentes concentrações de anticorpos específicos para o antígeno IgG em uma solução de PBS por 2 horas a 4 °C. Os substratos foram novamente lavados com PBS e incubados em uma solução de 100 µg/mL de albumina de soro bovino (BSA) por 16 horas a 4 °C. Em seguida, foram lavados novamente com PBS para remover o excesso de BSA. O sistema foi incubado na suspensão de antígeno em PBS (1 a 150 µg/mL) por 2 horas a temperatura ambiente. Após cada etapa, os substratos foram submetidos secos sob fluxo de N<sub>2</sub>, e espectros UV-VIS foram registrados para monitorar a funcionalização do biossensor e a detecção do analito.

Figura 12 - Esquema geral de funcionalização do biossensor e detecção do antígeno.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.2.6.2 Experimento controle

Para o experimento de controle, os substratos funcionalizados com anti-IgG foram incubados em uma solução de IgM em PBS (100 µg/mL) por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, os substratos foram lavados com PBS e secos sob fluxo de N<sub>2</sub>.

### 3.2.6.3 Detecção de ATP

Para a detecção de ATP, os nanocompósitos foram funcionalizados conforme descrito na Seção 3.3.6.1. Em seguida, os substratos foram incubados em uma solução de anti-ATP em

PBS (100 µg/mL) por uma hora à temperatura ambiente e tratados com soluções de ATP (faixa de concentração: 1 a 100 µg/mL).

#### 3.2.6.4 Caracterização

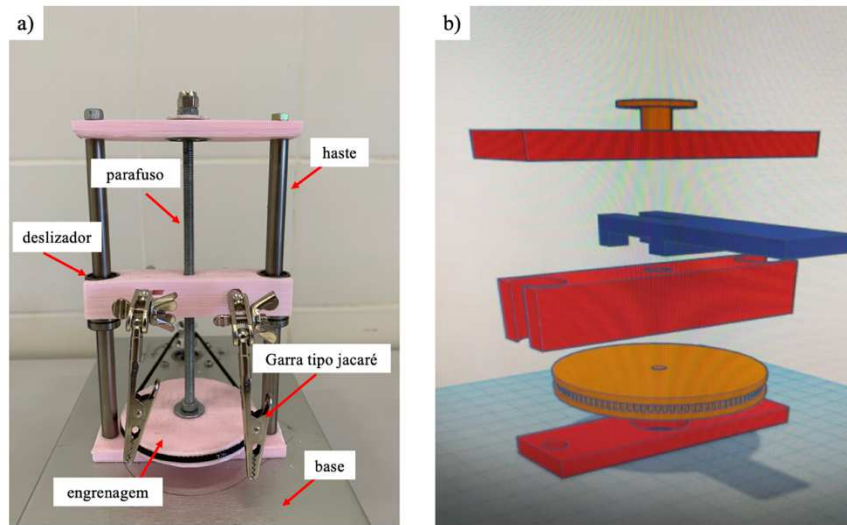
A análise Raman e os mapeamentos SERS foram realizados utilizando o microscópio Raman Renishaw inVia, com linha de excitação  $\lambda_0 = 785$  nm, lente objetiva de  $20\times$  e tempo de exposição de 3 s. Os mapeamentos SERS foram executados em uma área de  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ . Para o mapeamento SERS do experimento de funcionalização do substrato AuNPs/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>, foram coletados 100 espectros; para a detecção de diferentes concentrações de IgG, foram registrados 2500 espectros; e para a detecção de ATP, foram coletados 1350 espectros. Todos os espectros tiveram a linha de base corrigida e foram normalizados. Em seguida, foram analisados utilizando a análise de Componentes Principais (PCA) no software MATLAB (The Mathworks, Natick, MA, EUA). O PCA é um modelo não supervisionado que simplifica a visualização de dados de alta dimensão, transformando-os em conjuntos de dados menores conhecidos como Componentes Principais (PCs), preservando a maioria das características espectrais originais e destacando as diferenças entre as amostras (AUSTIN SUTHANTHIRARAJ; SEN, 2019).

### 3.2.7 Construção do Equipamento de *dip-coating*

#### 3.2.7.1 Estrutura mecânica

Para a construção do equipamento de *dip-coating* foram empregados uma base metálica (largura = 13,6 cm; altura = 5,9 cm; comprimento = 33,2 cm), dois deslizadores, duas hastes (amplitude máxima = 11,9cm), um parafuso, motor de passos, uma engrenagem feita na impressora 3D (diâmetro = 6,7 cm) e duas garras do tipo jacaré (Figura 13a). As partes de sustentação foram produzidas em uma impressora 3D (Figura 13b).

Figura 13 - Equipamento de dip-coating e (b) projeto para impressora 3D.

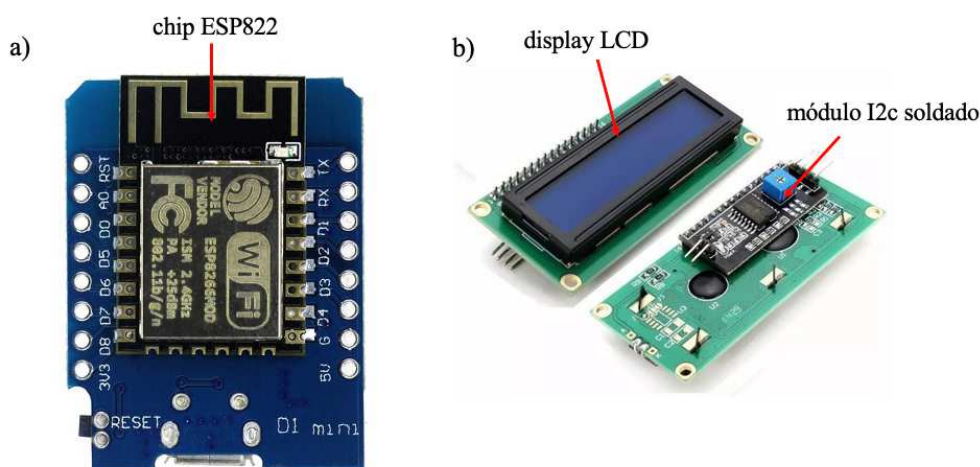


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.2.7.2 Estrutura eletrônica

Como fonte de alimentação do equipamento utilizamos uma fonte de dupla voltagem 12 V e 5 V de um DVD usado. Além disso, foram utilizados um driver A4988 para controlar o motor de passos, placa de soldagem, fios. A Placa Wemos D1 mini com o chip Wi-Fi ESP8266, que contém o código que faz o gerenciamento da conexão Wi-Fi, (Figura 14a) foi utilizada para fazer a interface Wi-Fi entre o controlador e os clientes. O display de LCD 16 x 2 com módulo I2c soldado responsável pela conexão do display com outros dispositivos (Figura 14b) tem a função de mostrar as informações para o usuário, como a página que deve ser acessada para controlar o *dip-coating*.

Figura 14 - (a) Placa Wemos D1 mini com o chip Wi-Fi ESP8266 e (b) display de LCD 16 x 2 com módulo I2c soldado.



Fonte: Wemos.cc (2019); Eletrogate (2018).

### 3.2.7.3 Software

O software empregado para programação foi o Arduino IDE (*Integrated development environment*). No Anexo 1 encontra-se o código desenvolvido em uma linguagem própria da plataforma baseada nas linguagens C e C++. As seguintes bibliotecas foram utilizadas para fazer a interface Wi-Fi `index1.h`, `ESP8266WiFi.h`, `WiFiClient.h`, `ESP8266WiFiMulti.h`, `ESP8266mDNS.h`, `ESP8266WebServer.h`. As bibliotecas `Wire.h`, `LiquidCrystal_I2C.h` foram utilizadas para fazer a conexão com o display LCD. A conexão entre o computador e o WEMOS D1 mini foi feita através de cabo USB.

### 3.2.7.4 Síntese de filmes finos automontados por *dip-coating*

Inicialmente, as lâminas de vidro (1 cm × 3 cm) foram limpas e modificadas seguindo o procedimento descrito na seção 3.3.1. Em seguida, utilizando a técnica de *dip-coating*, as lâminas de vidro foram imersas na solução de PS-b-P2VP (0,5 % v/v) a uma velocidade constante de 37,5 mm/s por 15 minutos e retiradas na mesma velocidade. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água deionizada e secas. Após essa etapa, os slides de vidro foram imersos na solução coloidal por 1 hora, seguido de uma lavagem com água deionizada e secagem. Esse procedimento foi repetido várias vezes para obter o número desejado de bicamadas. Além disso, filmes de monocamada AuNP/PS-b-P2VP foram fabricados, variando

o tempo de imersão na solução de AuNPs entre 30 min e 1 h. Após cada etapa, foram obtidos espectros de absorção UV-VIS e espectros SERS do corante Azul do Nilo ( $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) para monitorar o processo de automontagem.



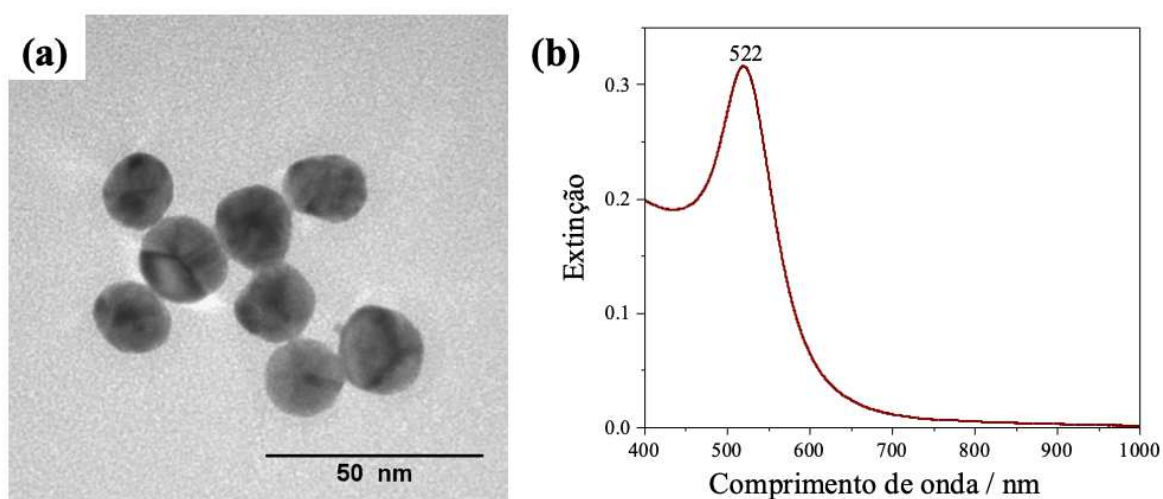
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas próximas seções serão apresentados os resultados obtidos nesse trabalho referente a fabricação de filmes finos de AuNPs de ouro adsorvidas em matrizes de PS-b-P2VP e as aplicações dos nanocompósitos produzidos como substratos SERS recicláveis e biossensores.

### 4.1 SÍNTESE DE NPS DE OURO

As NPs de ouro utilizadas nesse trabalho foram sintetizadas seguindo a metodologia descrita por Frens, a qual permite o controle do tamanho das AuNPs esféricas produzidas mediante a modulação da razão  $[AuCl_4]^- / Citrato$  (FRENS, 1973). A Figura 15a apresenta a imagem obtida por TEM das NPs sintetizadas, com tamanho médio de  $(17 \pm 2 \text{ nm})$ . Além disso, foi realizada medida de extinção na região do UV-VIS, ilustrada na Figura 15b. Observou-se uma banda estreita com máximo em 522 nm, característica do plasmon de superfície de NPs de ouro. O perfil espectral da banda associado com as imagens de TEM indicam que foram sintetizadas NPs esféricas com baixa dispersão de tamanho.

Figura 15 - (a) Imagem representativa de TEM e (b) espectro UV-VIS das NPs de ouro sintetizadas.



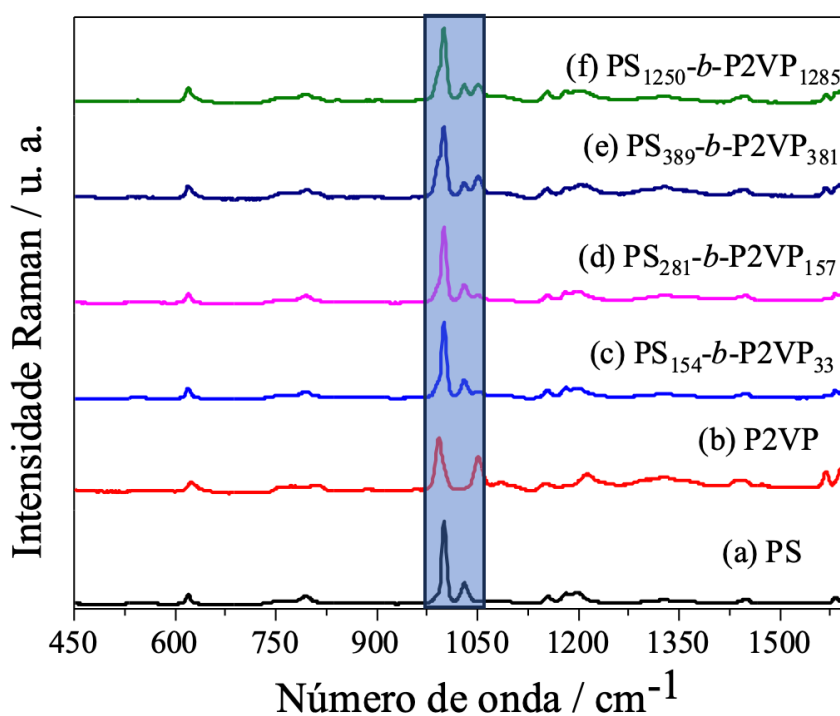
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS FILMES DE AuNP EM PS-b-P2VP

A Figura 16 apresenta uma comparação entre os espectros Raman dos sólidos dos homopolímeros PS e P2VP, bem como dos copolímeros empregados nas sínteses de

nanocompósitos apresentados neste trabalho. O espectro Raman do PS apresenta uma banda intensa em  $1001\text{ cm}^{-1}$  que está relacionada ao modo  $\nu(1)$ , respiração totalmente simétrica do anel benzênico, e uma banda de intensidade média em  $1032\text{ cm}^{-1}$  referente ao modo  $\nu(18a)$ , deformação angular no plano. O homopolímero P2VP tem um anel piridínico no lugar do anel benzênico presente no PS e por isso as estruturas dos dois homopolímeros apresentam muitas semelhanças estruturais, o que se reflete nos espectros Raman. Contudo, certas diferenças espectrais podem ser observadas, como por exemplo, a banda em  $1052\text{ cm}^{-1}$  no espectro do P2VP, referente à respiração do CH no plano (modo  $\nu(18b)$ ) (ANEMA et al., 2010; TSAI et al., 1991). Além disso, podemos observar que os espectros Raman dos copolímeros PS-*b*-P2VP são uma combinação dos modos vibracionais dos homopolímeros.

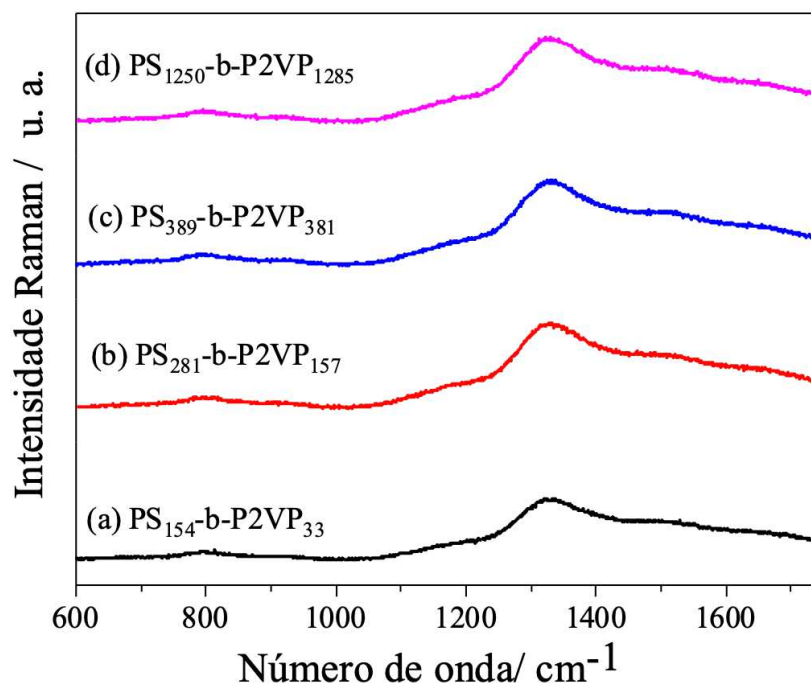
Figura 16 - Comparação entre os espectros Raman dos sólidos de: (a) PS, (b) P2VP, (c) PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (d) PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (e) PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub>, (f) PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os espectros Raman dos filmes finos de PS-*b*-P2VP são apresentados na Figura 17. Os filmes foram preparados em substrato de ouro para aumentar a intensidade das bandas, porém pode-se observar que as bandas características do copolímero não estão presentes devido à espessura dos filmes e baixa secção de choque desses compostos.

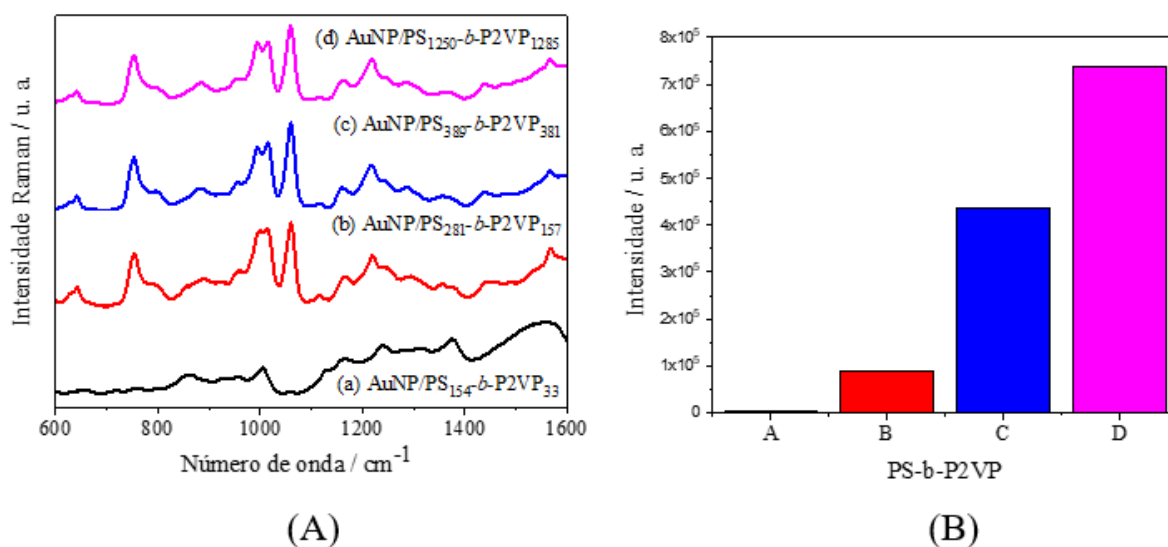
Figura 17 - Espectros Raman dos filmes finos de: (a) PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub>, (d) PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Após a imersão dos filmes na solução coloidal por 6 horas, os substratos foram novamente analisados através da espectroscopia Raman (Figura 18A). Observa-se a intensificação, principalmente, das bandas referentes aos modos  $\nu(1)$ ,  $\nu(18a)$  e  $\nu(18b)$ , observadas nos espectros Raman dos copolímeros sólidos. É importante destacar o aumento da intensidade da banda a  $750\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde ao modo  $\nu(11)$ , indicando a adsorção do polímero por coordenação do o nitrogênio presente na unidade P2VP à nanopartícula. A intensidade dessa banda não é tão pronunciada em 18A (a) devido à presença minoritária do bloco P2VP no PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>. Adicionalmente, observa-se um aumento progressivo da intensidade das bandas Raman com o aumento da massa molecular dos copolímeros (Figura 18B).

Figura 18 – (A) Comparação entre os espectros SERS médios dos filmes finos de: (a) PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub>, (d) PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>. (B) Gráfico de intensidade da banda em 1060 cm<sup>-1</sup>, respectivamente.



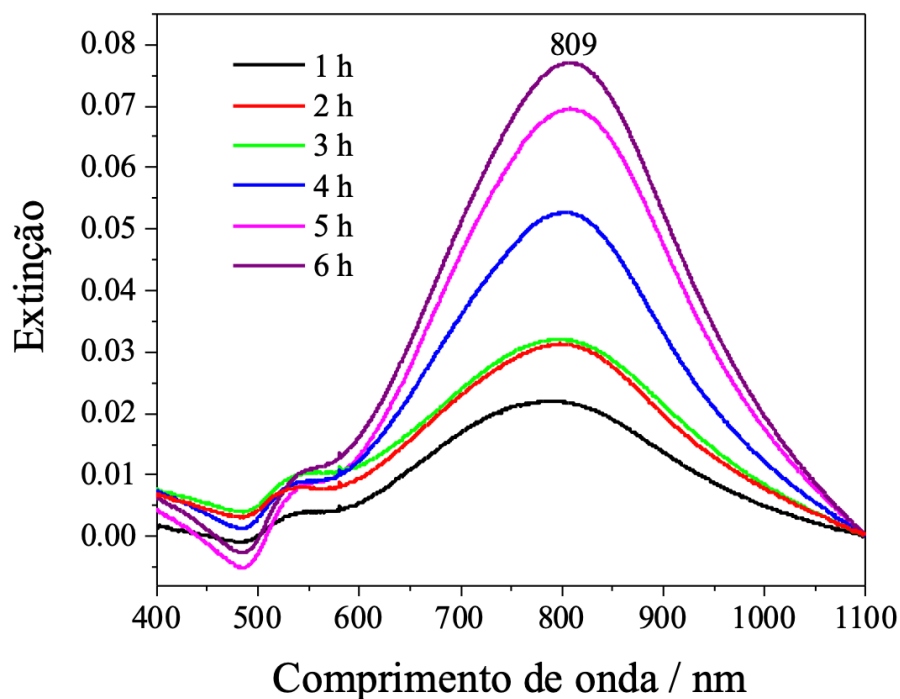
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.3 FILMES FINOS DE AUNP EM P2VP

Filmes finos de P2VP foram empregados como matrizes para adsorção de nanobastões de ouro (JIANG et al., 2012). Assim, nesse trabalho iremos comparar os resultados dos filmes finos de AuNP/P2VP com os obtidos para os filmes finos de AuNPs adsorvidas em PS-*b*-P2VP.

A Figura 19 apresenta os espectros UV-VIS para os filmes de AuNP/P2VP, com o tempo de imersão na solução coloidal variando de 1 h a 6 h. Pode-se observar que os espectros apresentam uma banda larga em 809 nm e um ombro em torno de ~ 540 nm, indicativo da presença de aglomerados de NPs. Além disso, observa-se com o aumento do tempo de imersão na solução coloidal um aumento gradativo do máximo de absorção, resultado também observado nos filmes preparados com o copolímero.

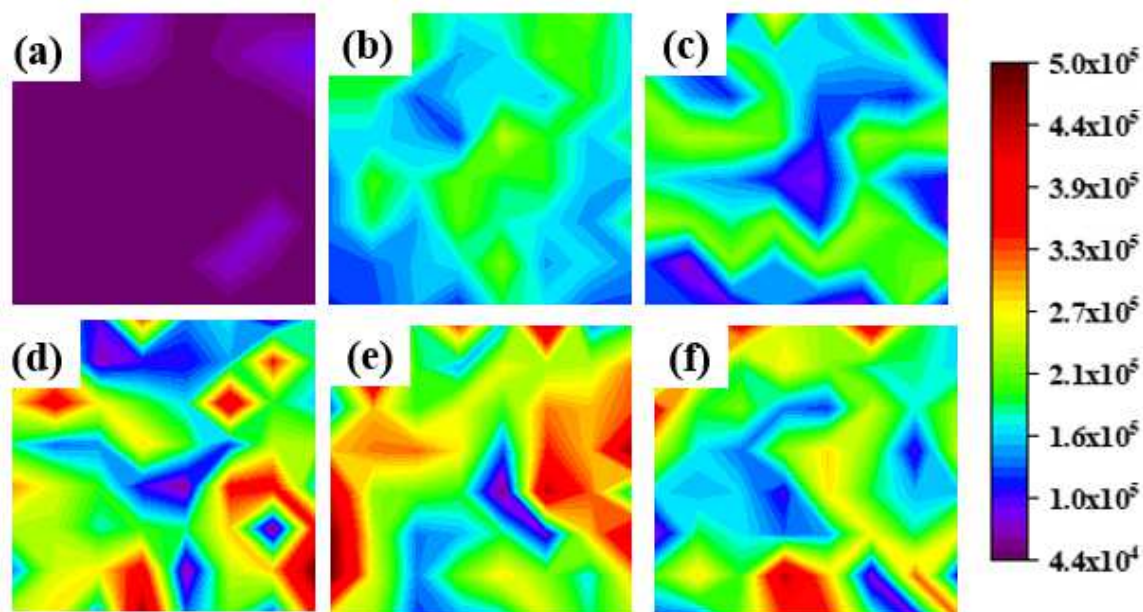
Figura 19 - Espectros UV-VIS do filme fino de AuNPs adsorvidas em P2VP.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na Figura 20 são apresentados os mapeamentos SERS do NB dos filmes de AuNP/P2VP com os tempos de imersão de 1 h a 6 h. Observa-se um aumento do sinal SERS com o aumento do tempo de imersão e que o sinal SERS não é uniforme. Assim, foram utilizados filmes finos de PS-b-P2VP fabricados por *spin-coating* para a adsorção mais homogênea de AuNPs.

Figura 20 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB adsorvido nos filmes finos de AuNPs em P2VP com diferentes tempos de imersão na solução coloidal: (a) 1 h, (b) 2 h, (c) 3 h, (d) 4 h, (e) 5 h e (f) 6 h.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

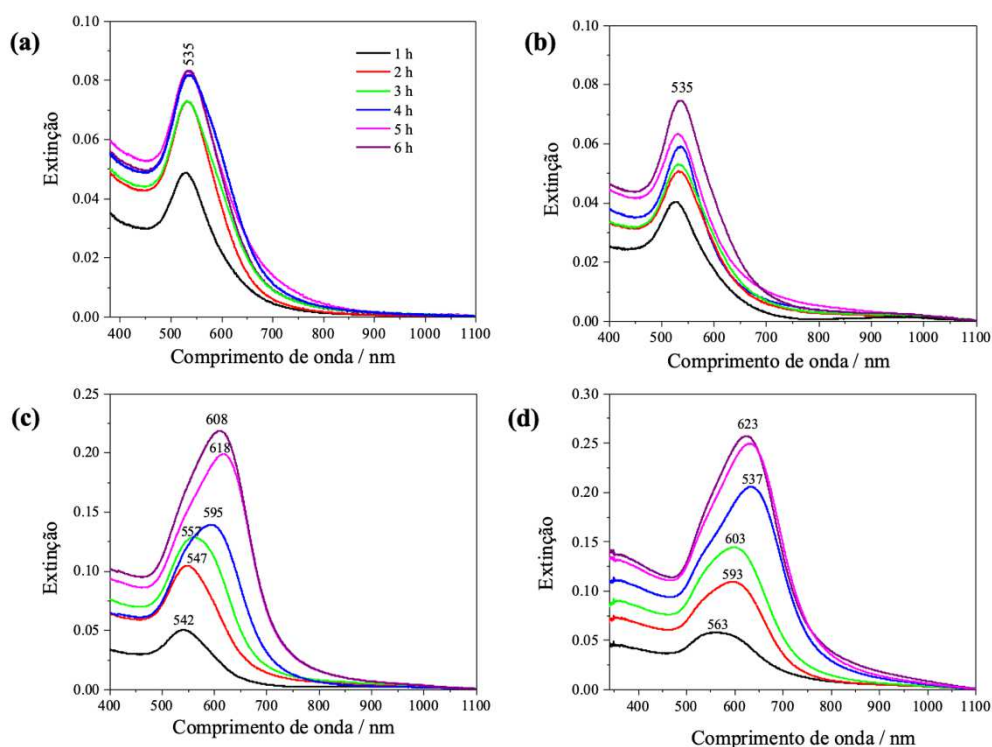
#### 4.4 FILMES FINOS DE AUNP/PS-*b*-P2VP RECONSTRUÍDOS EM H<sub>2</sub>O

Polímeros do tipo BCPs anfífilicos, ao serem dissolvidos em solventes apolares, têm a propriedade de formar micelas reversas, em que a parte apolar se dispõe formando a coroa, enquanto a parte polar compõe o núcleo da micela (KARAYIANNI; PISPAS, 2016).

Além disso, vários estudos demonstraram que é possível promover a reconstrução de filmes finos de BCPs anfífilicos por meio do tratamento do filme com solventes seletivos a um dos blocos, ocasionando a ruptura da micela (GUO; WANG; WANG, 2018; LUO et al., 2009; MALACHOSKY; FILATOV; GUYOT-SIONNEST, 2018; NORO et al., 2016; WANG; LI, 2011; ZHOU; ZHANG; WANG, 2019). Neste trabalho, empregamos água deionizada que é seletiva ao bloco P2VP. Assim, os filmes finos de PS-*b*-P2VP previamente preparados foram imersos em água, variando-se o tempo de imersão entre 1 e 6 h. A água é capaz de se difundir para o interior da micela, ocasionando o inchaço do núcleo composto por P2VP e rompimento parcial das micelas, formando poros organizados na superfície do filme polimérico (CHEN et al., 2010). Quando esses filmes finos são imersos na solução coloidal de ouro, observa-se a deposição das AuNPs nos microdomínios referentes ao bloco P2VP (LIU et al., 2013).

A Figura 21 apresenta os espectros de absorção UV-VIS das AuNPs adsorvidas nos filmes finos de PS-*b*-P2VP reconstruídos em H<sub>2</sub>O. Foi observado uma banda de absorção estreita para os filmes finos de menor massa molecular, AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> (Figura 20a) e AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub> (Figura 21b), em 541 e 535 nm, respectivamente. Esse resultado, comparado com o espectro da solução coloidal (Figura 15b), sugere que houve a adsorção controlada das AuNPs sem agregação. Porém, para os filmes finos formados pelos BCPs AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> (Figura 21c) e AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> (Figura 21d) foi observado que com o aumento do tempo de imersão dos filmes na solução coloidal, tem-se um aumento do valor da extinção, o deslocamento do máximo de absorção e o aparecimento de uma segunda banda em maiores comprimentos de onda. Estes resultados indicam que com o aumento do tamanho da cadeia do bloco P2VP tem-se uma mudança na morfologia do filme fino, deixando a superfície do filme mais hidrofílica, de forma que mais AuNPs são adsorvidas, levando ao acoplamento plasmônico entre AuNPs adjacentes observado.

Figura 21 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> reconstruídos em H<sub>2</sub>O.

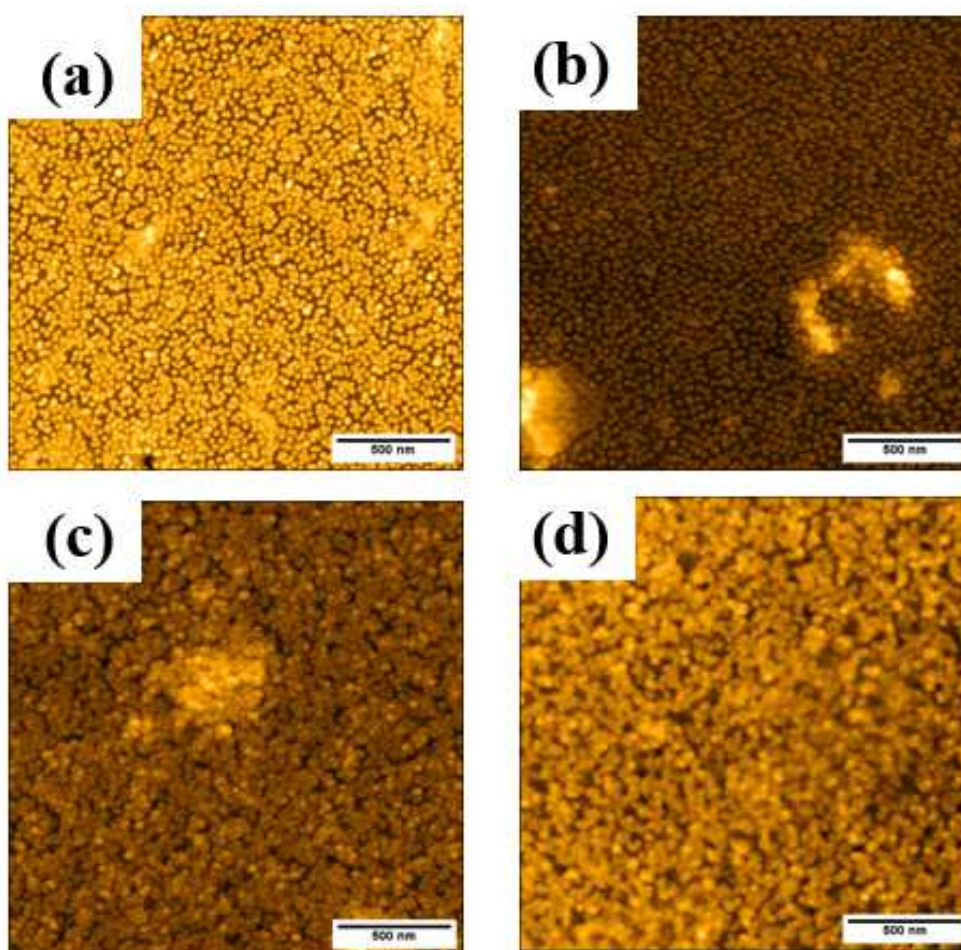


Fonte: Elaborado pela autora (2023).



Na Figura 22, são apresentadas as imagens de topografia de AFM dos filmes finos após 6 h de exposição à solução coloidal de ouro. É possível observar um aumento na quantidade de NPs adsorvidas com o aumento do tamanho da cadeia de P2VP do filme fino de PS-*b*-P2VP, na ordem  $PS_{154}\text{-}b\text{-}P2VP_{33} < PS_{281}\text{-}b\text{-}P2VP_{157} < PS_{389}\text{-}b\text{-}P2VP_{381} < PS_{1250}\text{-}b\text{-}P2VP_{1285}$ , corroborando os resultados obtidos nas medidas de espectroscopia UV-VIS apresentadas na Figura 21.

Figura 22 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP reconstruídos em H<sub>2</sub>O: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

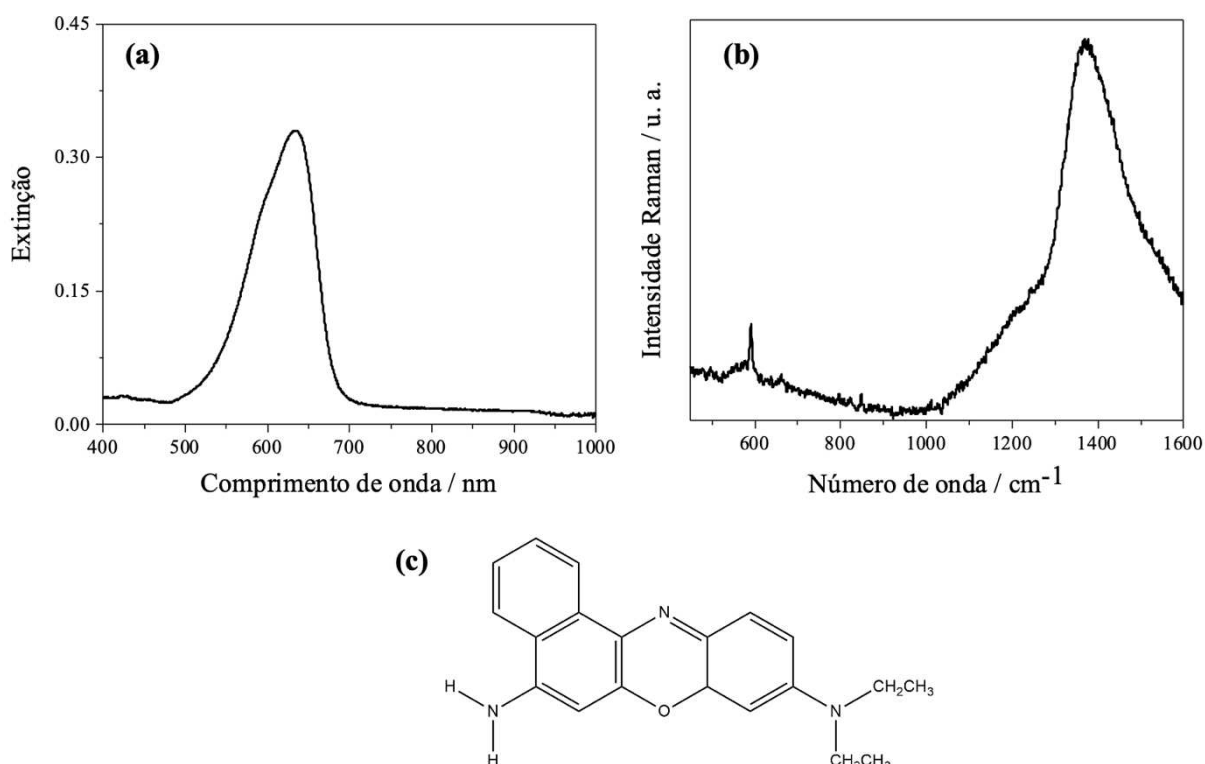
Esse aumento na quantidade de NPs adsorvidas é refletido no sinal SERS produzido pelos filmes. Foram realizados mapeamentos SERS da molécula prova, azul do Nilo, a uma



concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L, depositada sobre os filmes finos de AuNPs adsorvidas em PS-*b*-P2VP.

No espectro UV-VIS do azul do Nilo, apresentado na Figura 23a, pode ser observado que o composto se encontra em condição de pré-ressonância com a linha de excitação utilizada na realização do mapeamento SERS em 785 nm. Isso é evidenciado pela presença de uma banda larga com máximo de absorção em 635 nm. Além disso, na Figura 23b, observa-se que apenas a solução de azul do Nilo depositada sobre o substrato de vidro limpo não apresenta efeito SERS, exibindo uma banda de pequena intensidade em torno de  $590 \text{ cm}^{-1}$ , referente às vibrações do anel fenoxazina, Figura 23c (BROLO; ARCTANDER; ADDISON, 2005) (REKHA; NAYAR; GOPCHANDRAN, 2018).

Figura 23 - (a) Espectro UV-VIS da solução aquosa da NB, (b) espectro Raman da solução de Azul do Nilo depositada sobre o substrato de vidro ( $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L) e (c) estrutura química.

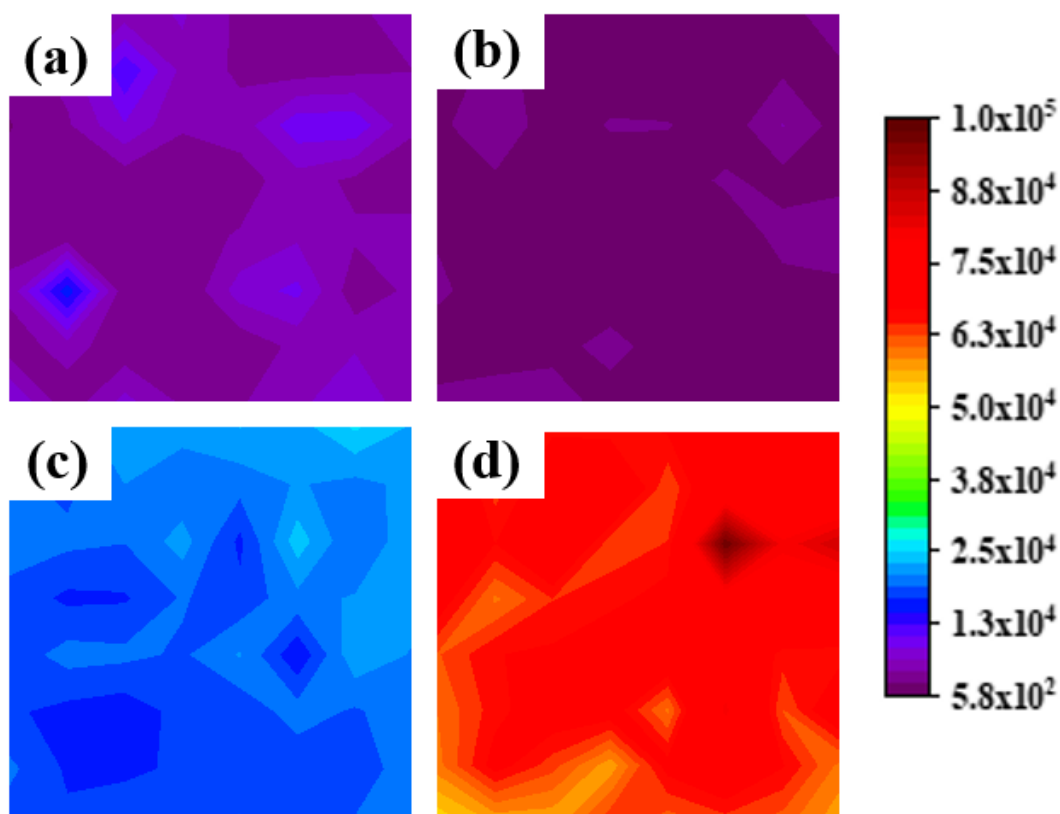


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 24 apresenta os mapeamentos SERS dos filmes de AuNPs/PS-*b*-P2VP. Observa-se que o sinal SERS é bastante uniforme por toda a superfície do filme. Além disso, à medida que a densidade de NPs adsorvidas aumenta e ocorre a agregação delas, a intensidade do sinal SERS aumenta significativamente. Esse efeito é devido ao aumento no número de 'hot

spots', áreas com intensificação significativa do sinal Raman, nas junções das NPs adjacentes. (FARCAU; ASTILEAN, 2010; MOSKOVITS, 2005). Além disso, há um aumento na ressonância das estruturas maiores com o laser de 785 nm.

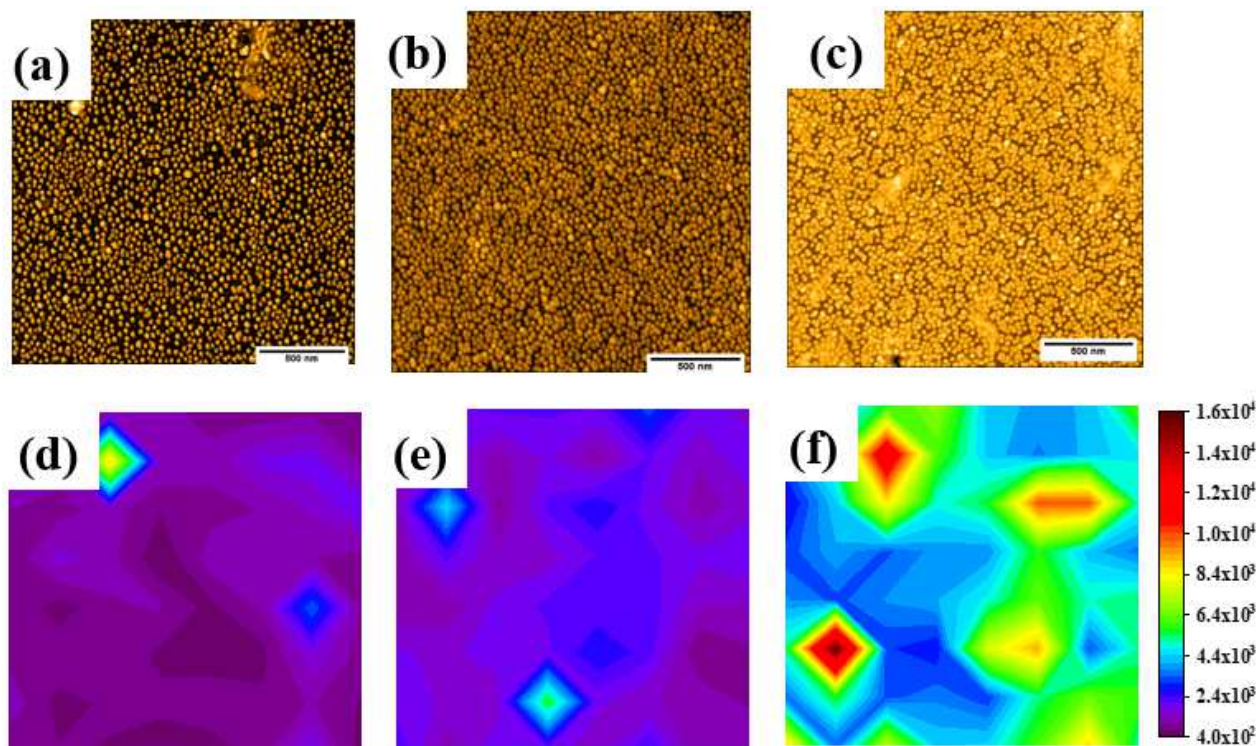
Figura 24 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP reconstruídos em  $\text{H}_2\text{O}$ : (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para compreender o processo de adsorção das AuNPs na superfície dos filmes finos de PS-*b*-P2VP, foram realizadas medidas de microscopia de AFM e mapeamento SERS do azul do Nilo nos filme de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> após 1, 3 e 6 h de exposição à solução coloidal de ouro (Figura 25). Comparando-se as imagens de AFM dos filmes AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> – 1 h (Figura 25a) e AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> – 3 h (Figura 25b) com a imagem de AFM do filme de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> – 6h (Figura 25) tem-se que a densidade de NPs adsorvidas aumenta com o tempo de exposição, sendo em torno de 580, 912 e 1016 NPs  $\mu\text{m}^{-2}$ , respectivamente. Ainda, pode-se observar que com o aumento da densidade de NPs adsorvidas, há um aumento da intensidade do sinal SERS, devido à formação de *hot spots*.

Figura 25 - Imagens de AFM dos filmes finos (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub> – 1 h, (b) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub> – 3 h e (c) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub> – 6 h, e seus respectivos mapeamentos SERS 50 × 50 μm<sup>2</sup> da banda em 594 cm<sup>-1</sup> do NB (d – f).



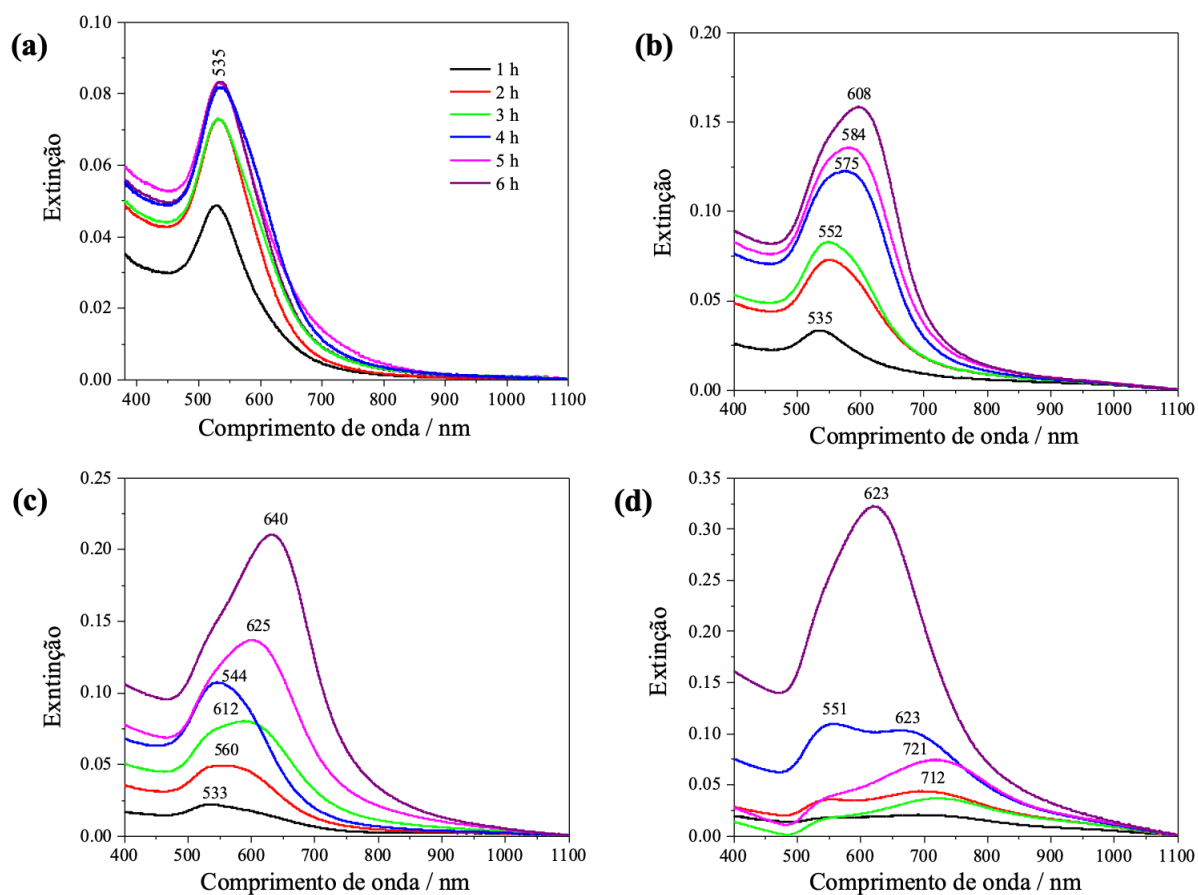
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.5 FILMES FINOS DE AUNP/PS-B-P2VP RECONSTRUÍDOS EM ETANOL

Analisando os espectros UV-VIS apresentados na Figura 26, observa-se um deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda maiores e um alargamento da banda com o aumento do tempo de exposição dos filmes de PS-*b*-P2VP à solução coloidal de ouro e com o aumento do tamanho da cadeia de P2VP. Estudos anteriores demonstraram a dependência do máximo de absorção devido ao LSPR com a forma, tamanho e distância entre nanopartículas (GOESMANN; FELDMANN, 2010; LIU et al., 2013). Dessa forma, tem-se que mais nanopartículas são adsorvidas sobre o filme com o aumento da cadeia de P2VP, levando à formação de agregados. Com a diminuição do espaçamento entre as nanopartículas, é esperado o acoplamento plasmônico entre nanopartículas próximas (GHOSH; PAL, 2007). Ou seja, com a organização ou agregação de AuNPs, observa-se o deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda mais altos, quando comparado com o máximo da banda de LSPR de nanopartículas isoladas (RECHBERGER et al., 2003). Além disso, podemos

observar uma mudança de coloração dos filmes que passam de vermelho a roxo, indicativo do deslocamento do LSPR das AuNPs (STORHOFF et al., 1998).

Figura 26 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> reconstruídos em etanol.



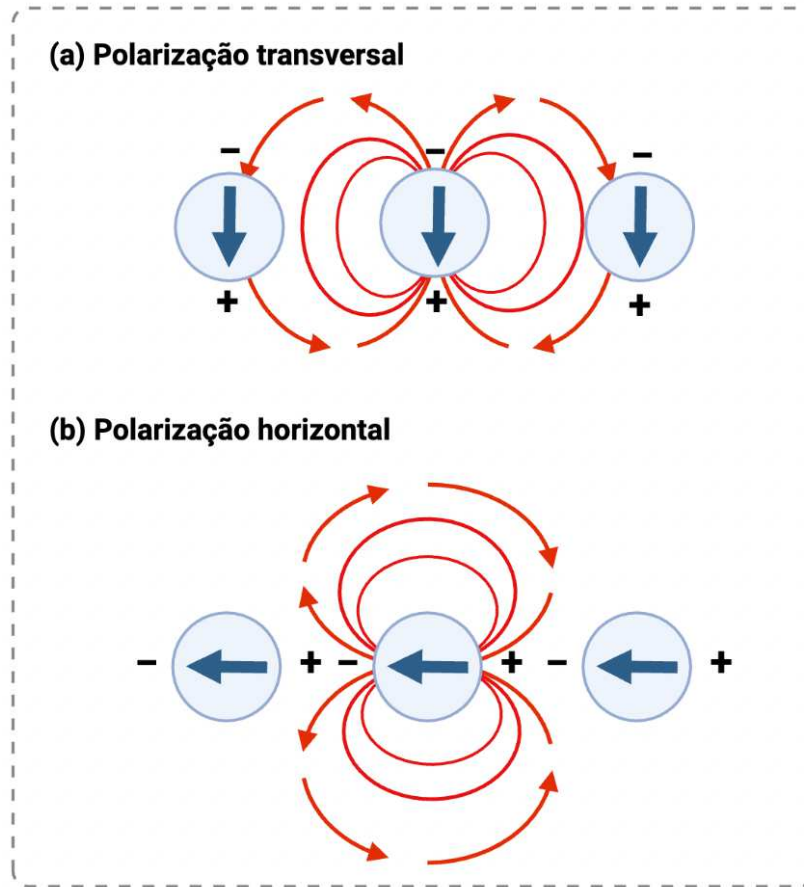
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Assim, ao compararmos os resultados obtidos para os filmes reconstruídos em água (Figura 21b-c) com os reconstruídos por imersão em etanol (Figura 26b-c), observamos um aumento no máximo de absorção e/ou um alargamento da banda. Além disso, ao compararmos os resultados obtidos para o filme de AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> com reconstruídos em água (Figura 21d) e aqueles reconstruídos por imersão em etanol (Figura 26d), observa-se uma banda em 558 nm, relacionada ao LSPR de nanopartículas isoladas e uma banda de maior intensidade em torno de ~ 622 nm, referente ao acoplamento plasmônico.

Esses resultados podem estar relacionados ao fato de que o etanol e água atuam de forma similar no processo de reconstrução do filme polimérico: difusão, aumento e abertura da micela. A afinidade entre o solvente e o microdomínio de P2VP irão determinar o grau em que esse processo irá ocorrer. Etanol é um melhor solvente para o bloco P2VP do que a água, assim, quando o filme fino de PS-*b*-P2VP é imerso em etanol ocorre uma rápida difusão do solvente para o interior da micela até a sua ruptura completa, permitindo uma reorganização da morfologia do filme, através do aumento da mobilidade das cadeias de P2VP. A morfologia micelar inicial rapidamente é reconstruída dando origem a uma morfologia que contém mais microdomínios de P2VP expostos (CHEN et al., 2010). Em contrapartida, quando usamos água como solvente essa reconstrução é limitada. Consequentemente, a superfície dos filmes finos de PS-*b*-P2VP, após a reconstrução por imersão em etanol, torna-se mais hidrofílica do que aquela dos filmes imersos em água. Isso resulta na adsorção de mais AuNPs, levando à formação de aglomerados e ao alargamento da banda de absorção. Isso ocorre porque a quantidade de NPs apreendidas nos domínios de P2VP é diretamente proporcional a esses efeitos observados. Porém, como o filme produzido utilizando o polímero PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> possui uma cadeia de P2VP menor, acredita-se que mesmo empregando o etanol como solvente, as cadeias de P2VP adjacentes não fundem, levando ao padrão espectral semelhante observado no UV-VIS (Figura 21a e Figura 26a).

Além disso, podemos observar no limite do máximo de absorção para menores comprimentos de onda entre os filmes após 5 e 6 h de imersão na solução coloidal. Esse deslocamento pode ser atribuído aos diferentes estágios de adsorção das AuNPs no substrato. Inicialmente, a maior parte das nanopartículas são adsorvidas em forma de aglomerados, porém com o aumento do tempo de imersão e da concentração de nanopartículas, um rearranjo das AuNPs pode ocorrer. Dessa forma, o campo elétrico externo próximo as nanopartículas, muda drasticamente, levando a um acoplamento dipolo-dipolo repulsivo devido à polarização transversal (Figura 27), resultando no aumento da frequência do plasmon (blue-shift) (JAIN; HUANG; EL-SAYED, 2007; MAIER, 2007; STETSENKO et al., 2017).

Figura 27 - Representação esquemática do acoplamento plasmônico entre nanopartículas próximas: (a) polarização transversal e (b) polarização longitudinal.

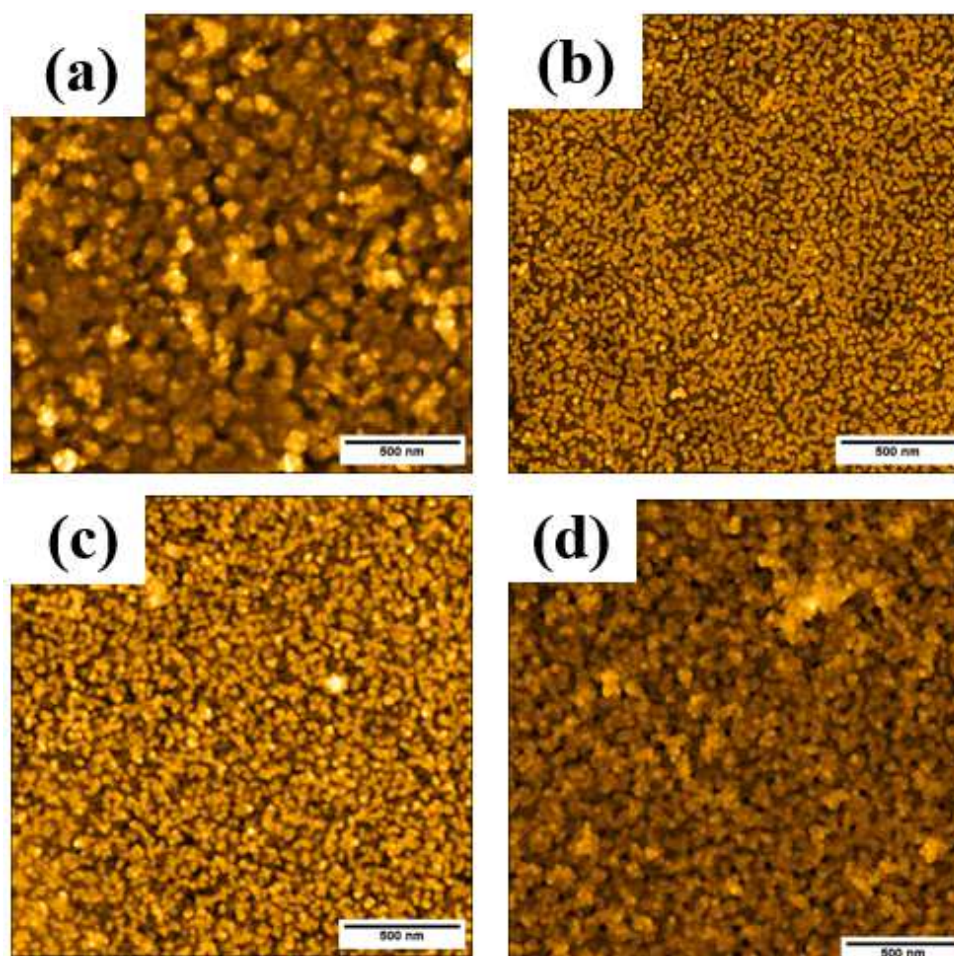


Fonte: Adaptado de MAIER (2007).

Assim como nos filmes de AuNP/PS-*b*-P2VP reconstruídos em água, as imagens de AFM para os filmes de AuNP/PS-*b*-P2VP tratados com etanol mostram um aumento da quantidade de NPs adsorvidas na superfície do filme de PS-*b*-P2VP com o aumento do tempo de exposição à solução de AuNPs (Figura 28).

Figura 28 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP reconstruídos em etanol: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.

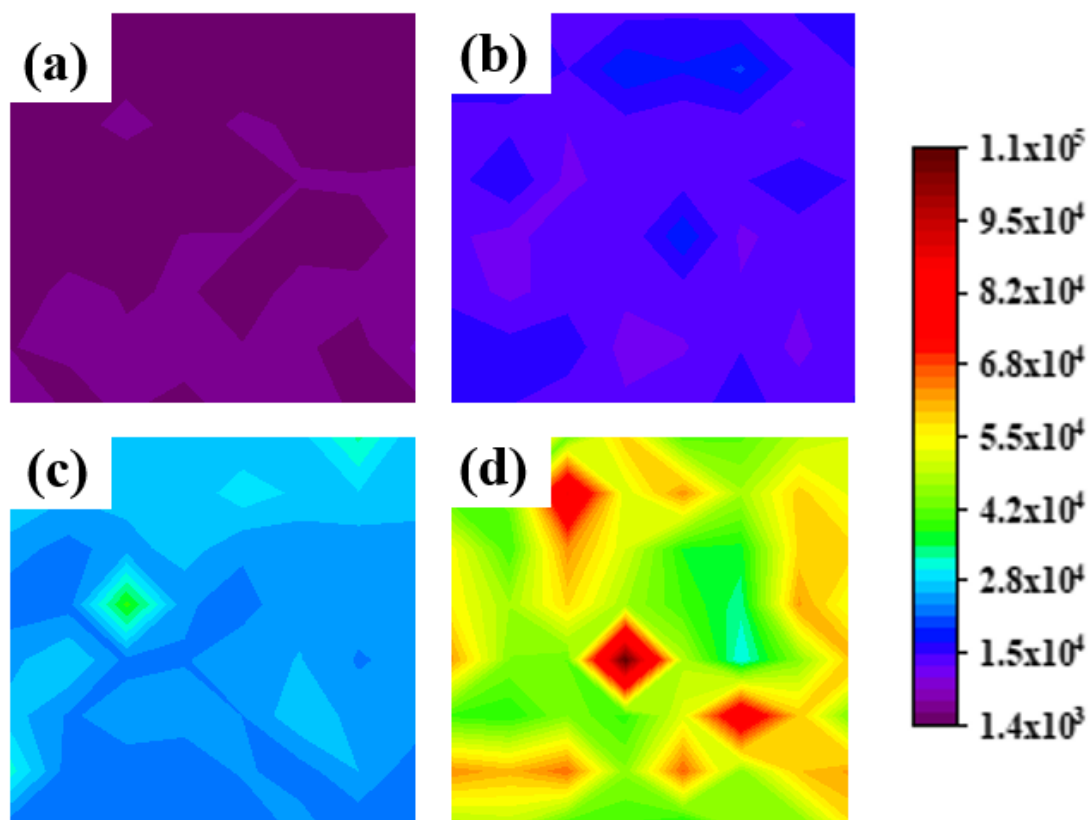




Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 29 apresenta os mapeamentos SERS dos filmes de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>. Observa-se que o sinal SERS apresenta uniformidade em toda a superfície do filme, demonstrando que as NPs estão bem dispersas em todo o filme. Além disso, há um aumento do sinal SERS com o aumento do microdomínio de P2VP, corroborando os resultados obtidos nos espectros UV-VIS apresentados na Figura 26. Ao comparar os mapeamentos realizados nos filmes tratados com etanol (Figura 29) com aqueles tratados com água (Figura 23), verifica-se que a intensidade do sinal SERS relacionado à banda em 594 cm<sup>-1</sup> do NB encontra-se na mesma ordem de magnitude, uma vez que o efeito SERS é capaz de intensificar o sinal Raman em várias ordens de magnitude (10<sup>6</sup>) (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Porém, pode-se observar a presença de mais regiões de alta intensificação do sinal SERS nos filmes tratados com etanol, uma vez que esses filmes apresentam uma maior quantidade de *hot spots* devido à presença de mais aglomerados de nanopartículas. Esse resultado corrobora o resultado observado nos espectros UV-VIS.

Figura 29 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP reconstruídos em Etanol: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.6 FILMES FINOS DE AuNP/PS-*b*-P2VP RECONSTRUÍDOS EM ATMOSFERA DE THF/TOLUENO

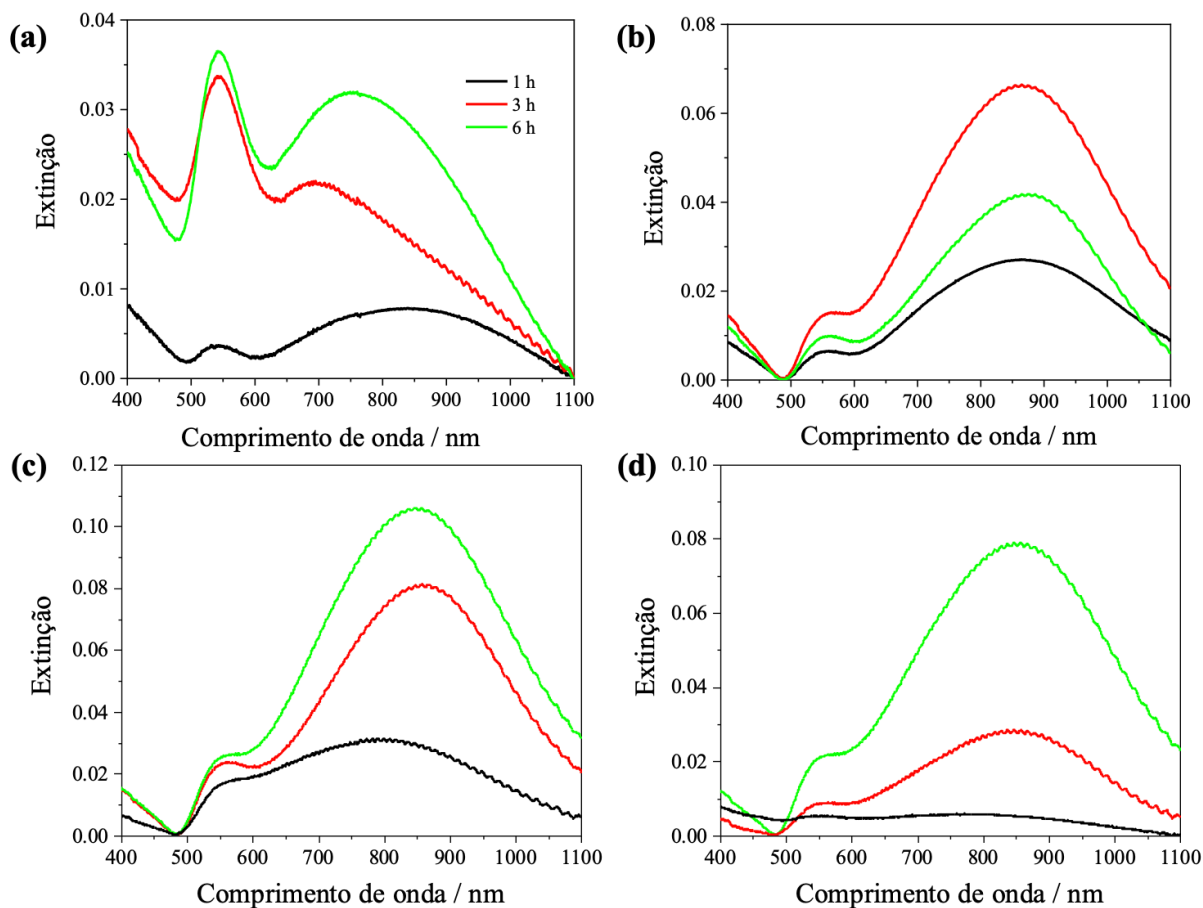
Após o processo de reconstrução em atmosfera de THF/tolueno, os filmes finos de PS-*b*-P2VP foram imersos em solução coloidal de ouro por diferentes períodos. A série de espectros UV-VIS da Figura 30 apresentam uma banda em  $\sim 540 \text{ nm}$  referente ao plasmon de superfície de NPs isoladas e uma outra banda mais intensa com máximo de absorção em  $\sim 750 \text{ nm}$  devido ao acoplamento plasmônico entre NPs. No caso dos filmes de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> (Figura 30a), pode ser observado no espectro UV-VIS, que após 3 h de imersão em solução de AuNPs, a banda em  $\sim 540 \text{ nm}$  possui intensidade maior do que a banda em  $\sim 750 \text{ nm}$ , indicando a predominância de NPs adsorvidas de forma isolada. Por outro lado, os espectros UV-VIS dos



filmes finos compostos por BCPs com cadeias de P2VP maiores apresentam a banda referente ao acoplamento plasmônico mais intensa do que a banda devido às NPs isoladas.

Ao comparar os valores de extinção dos filmes de AuNPs/PS-*b*-P2VP tratados em atmosfera de THF/Tolueno aos filmes tratados com água ou etanol (Figuras 21 e 26), observa-se que a extinção é relativamente mais baixa. Esses resultados indicam que o tratamento do filme polimérico com vapores de THF/Tolueno levam a uma morfologia com poucos microdomínios de P2VP disponíveis para a adsorção de NPs levando à adsorção de menos nanopartículas que nos filmes apresentados anteriormente e à formação de aglomerados.

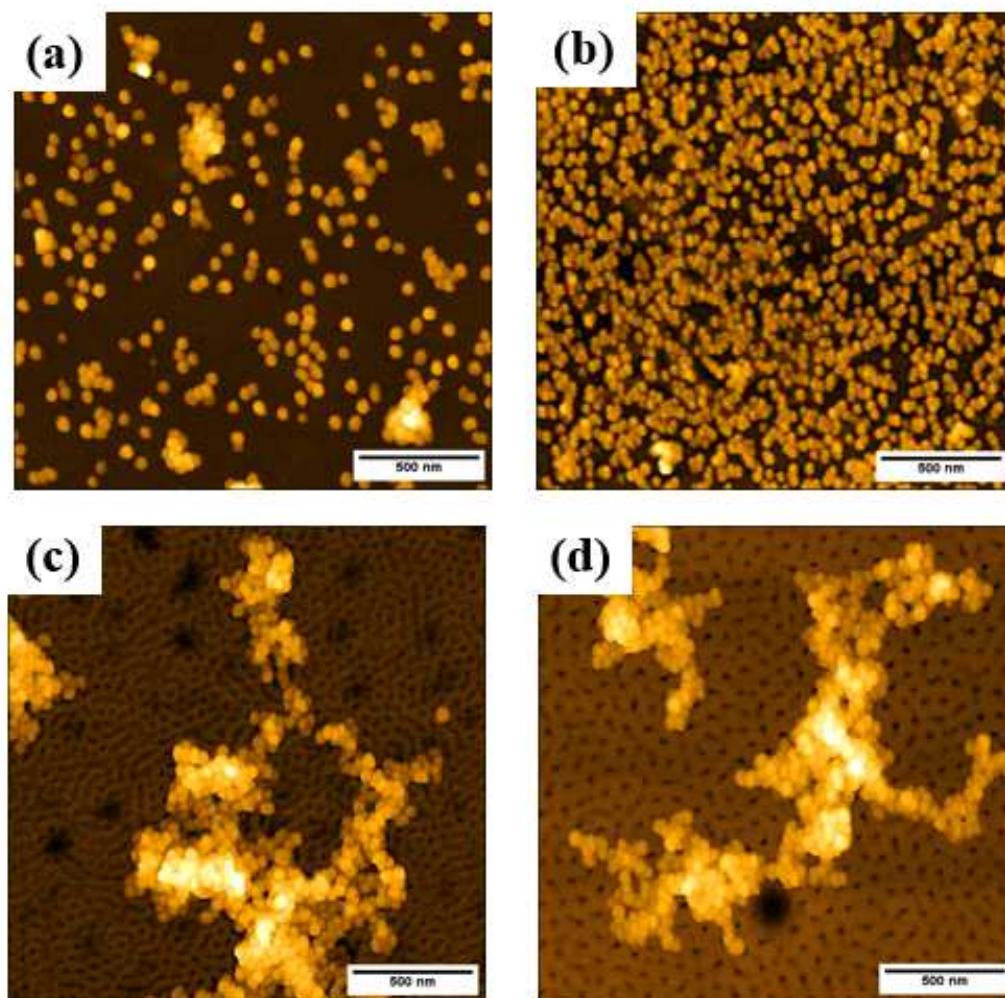
Figura 30 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As imagens de AFM apresentadas na Figura 31, confirmam os resultados obtidos na análise dos espectros UV-VIS (Figura 30). Assim, na imagem de AFM do filme AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub> (Figura 31a) observamos pequenos aglomerados, mas a maioria das NPs encontra-se adsorvida de maneira isolada. Com o aumento da cadeia de P2VP, observa-se nas imagens de AFM um aumento progressivo da quantidade de aglomerados de NPs. Além disso, vale ressaltar que com a exposição do filme fino de PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> ao vapor de THF/tolueno há a ruptura das micelas e a formação de vales de profundidade de  $(35,1 \pm 3,3 \text{ nm})$  (Figura 31d) (MALACHOSKY; FILATOV; GUYOT-SIONNEST, 2018).

Figura 31 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>.



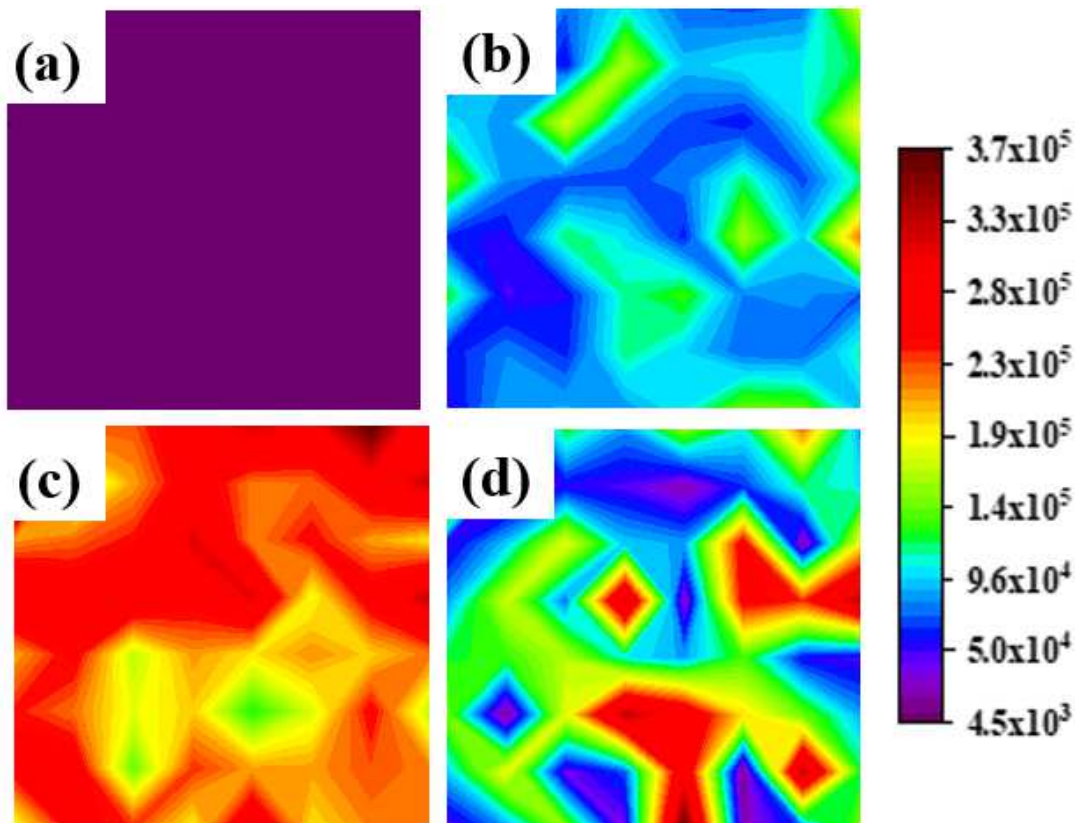
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os mapeamentos SERS apresentados na Figura 32, seguem o mesmo padrão das imagens de AFM da Figura 31, ou seja, com o aumento da quantidade de aglomerados de NPs presentes na superfície do filme, mais intenso é o sinal SERS gerado. Além disso, podemos observar que o sinal SERS é uniforme que os filmes tratados com água e etanol, em toda a região analisada.

É importante destacar que apesar do máximo de extinção para esses filmes ser menor do que para os filmes tratados com água ou etanol, a intensidade do sinal SERS gerado permanece na mesma ordem de magnitude. Esse resultado pode ser explicado pela formação de mais hot spots nos filmes tratados com vapor de Tolueno/THF. Assim, mesmo que menos nanopartículas estejam adsorvidas sobre o filme, o máximo de absorção relacionado ao LSPR

encontra-se próximo ao comprimento de onda do laser utilizado ( $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ ) de forma que o sinal SERS é mais eficiente (JEON et al., 2016).

Figura 32 - Mapeamento SERS  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>.



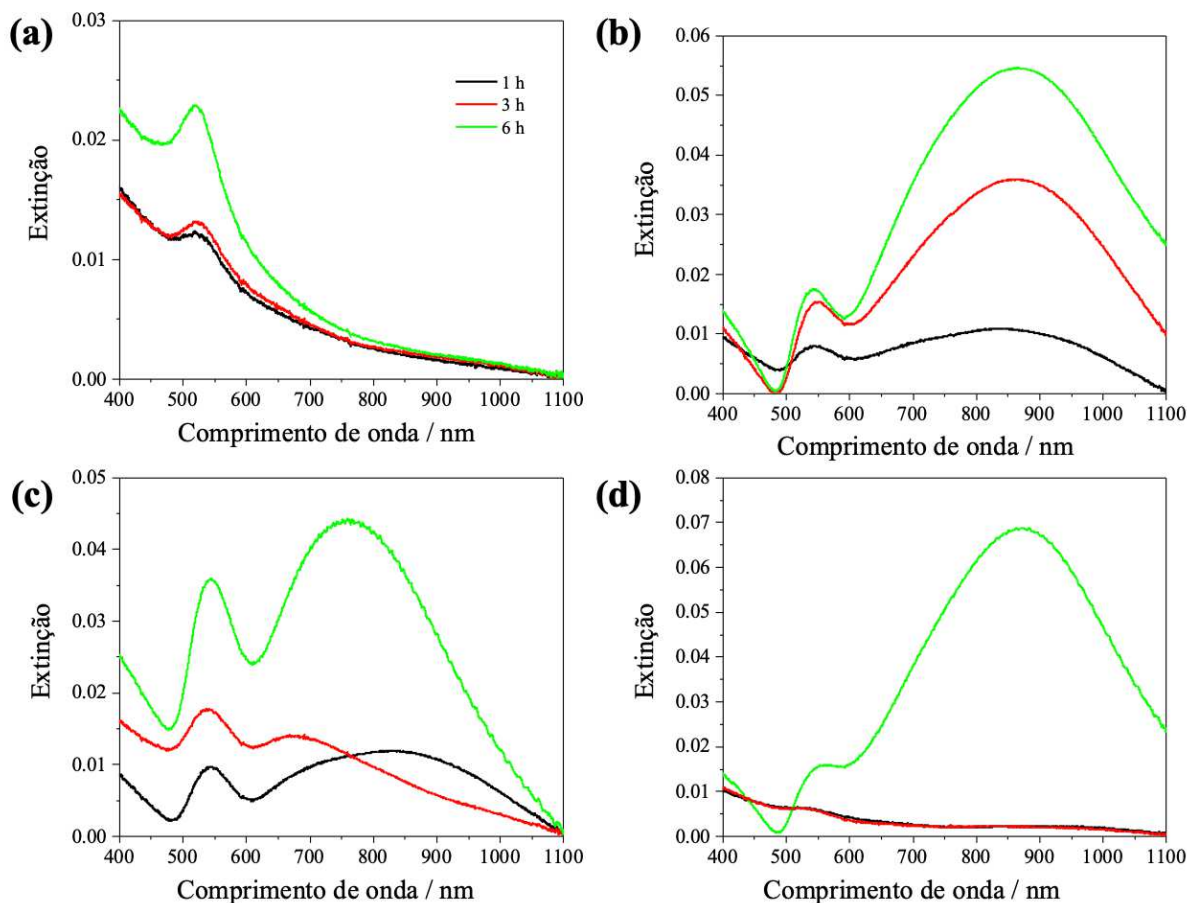
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.7 FILMES FINOS DE AUNP/PS-B-P2VP COM TRATAMENTO TÉRMICO

Em baixas temperaturas, a maioria dos polímeros são frágeis e vítreos, uma vez que não há energia suficiente para promover mobilidade na cadeia polimérica. Assim, o aumento de temperatura de um filme fino de BCP, acima da temperatura de transição vítrea ( $T_g$  – *glass transition temperature*) dos homopolímeros que o compõem ( $T_{gPS} = 100 \text{ °C}$  e  $T_{gP2VP} = 104 \text{ °C}$ ), permite uma maior mobilidade das cadeias e a reorganização dos blocos em uma nova morfologia de equilíbrio.

Devido ao fato de o tolueno ser um solvente preferencial para o bloco PS, o microdomínio de P2VP possui uma menor quantidade de solvente. Conseqüentemente, durante os primeiros estágios do aquecimento à 150 °C, a fase de P2VP se solidifica. O aumento do tempo de aquecimento leva à formação de uma camada contínua de PS abaixo das ilhas de P2VP formadas (HARIRCHIAN-SAEI et al., 2012). Dessa forma, há menos microdomínios de P2VP livres para a adsorção de AuNPs. Como pode ser observado nos espectros UV-VIS apresentados na Figura 33, que possuem extinção relativamente mais baixa que os filmes tratados com água ou etanol (Figuras 21 e 26), há menos NPs adsorvidas. Além disso, pode ser observado para os filmes de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, apenas uma banda em torno de ~ 540 nm referente ao plasmon de superfície de NPs isoladas. Porém, com o aumento da cadeia de P2VP e o aumento gradual do tempo de imersão, resulta no surgimento de uma segunda banda larga em comprimentos de onda maiores.

Figura 33 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> com tratamento térmico.

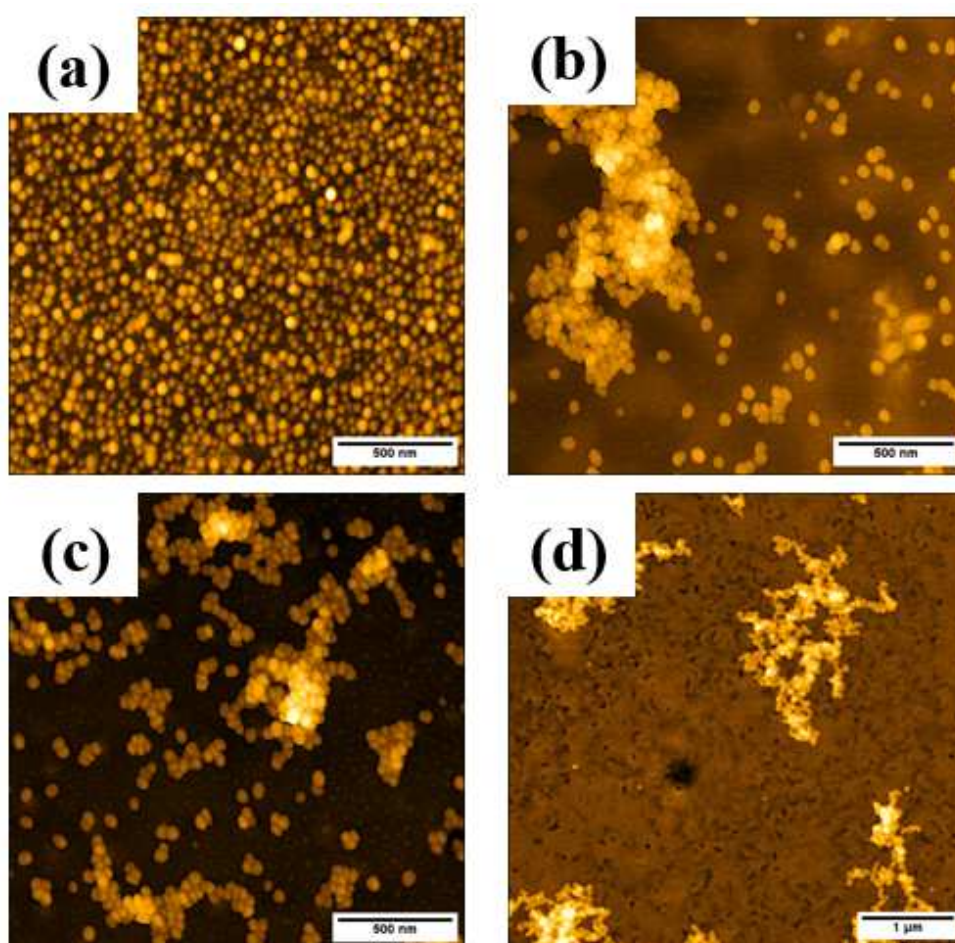




Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As imagens de AFM apresentadas na Figura 34, corroboram os resultados observados nos espectros UV-VIS. Assim, temos a formação de mais aglomerados e diminuição da quantidade de NPs isoladas com o aumento do tamanho do microdomínio de P2VP. Além disso, podemos observar nas imagens apresentadas nas Figuras 34c e 34d, que após o tratamento térmico, há o rompimento das micelas esféricas e reorganização do filme polimérico em uma morfologia que apresenta vales com profundidade de  $(15,4 \pm 5,5 \text{ nm})$  e  $(16 \pm 4 \text{ nm})$ , respectivamente (MALACHOSKY; FILATOV; GUYOT-SIONNEST, 2018).

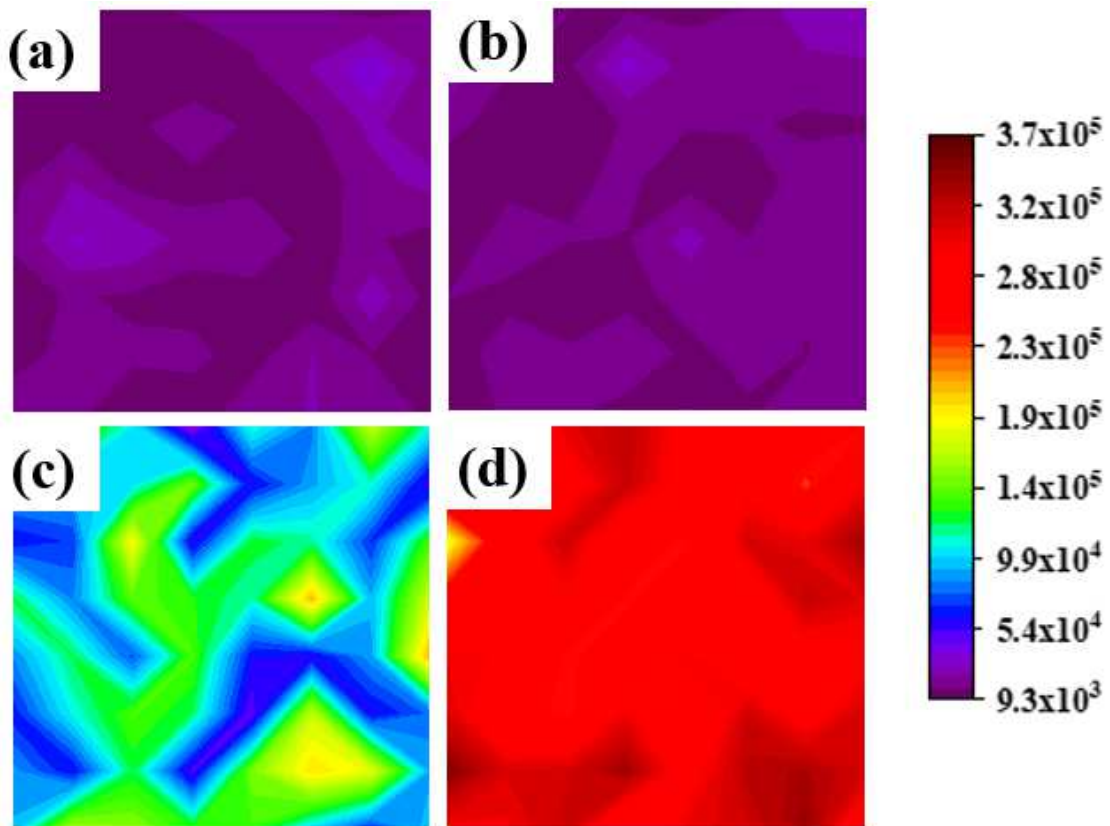
Figura 34 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP com tratamento térmico: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 35 apresenta os mapeamentos SERS dos filmes de AuNP/PS-*b*-P2VP com tratamento térmico. Pode-se observar que o mesmo que a intensidade da banda de LSPR no UV-VIS seja menor quando comparado aos filmes tratados com água e etanol, o sinal SERS encontra-se na mesma ordem de magnitude. Ou seja, mesmo que haja menos nanopartículas adsorvidas sobre os filmes, essas se encontram em agregados que são mais eficientes para intensificar o sinal SERS na linha laser utilizada ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ) (JEON et al., 2016). Sendo que a maior intensificação do sinal é obtida no filme AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> (Figura 35d) já que este apresenta a maior intensidade de extinção no comprimento de onda do laser utilizado (Figura 35d).

Figura 35 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP com tratamento térmico: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.

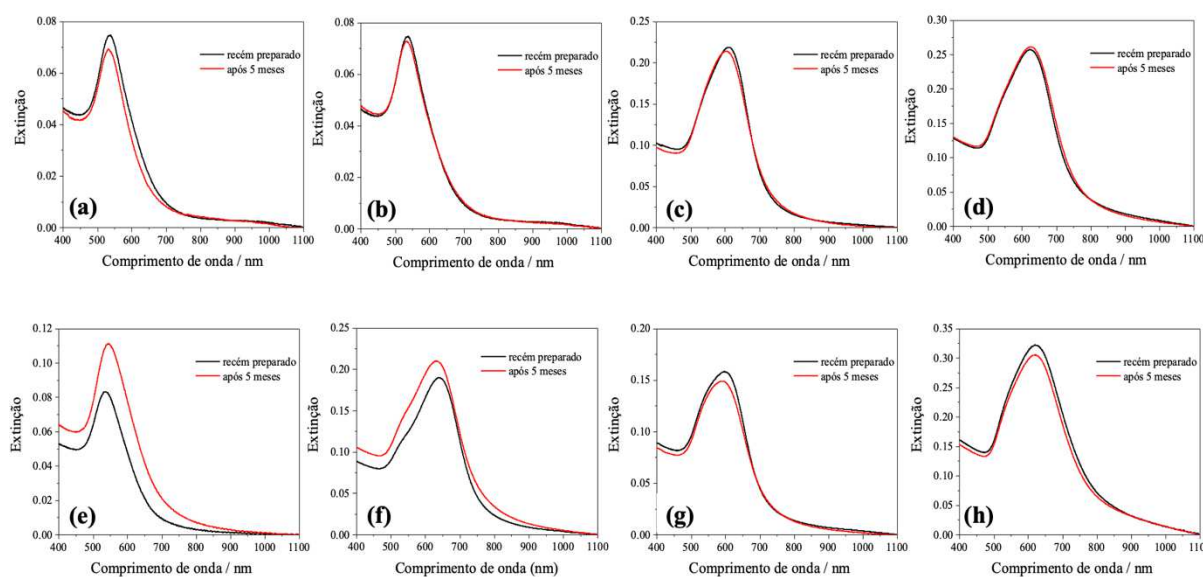


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.8 TESTE DE ESTABILIDADE

A Figura 36 apresenta uma série de espectros UV-VIS dos filmes finos de AuNP/PS-*b*-P2VP – 6 h tratados com água e etanol comparando os espectros dos filmes recém preparados e depois de cinco meses. Como pode ser observado, os substratos são estáveis com o passar do tempo, uma vez que não há nenhuma mudança significativa no perfil espectral após cinco meses. O mesmo comportamento foi observado com os outros tratamentos e tempos de deposição.

Figura 36 - Teste de estabilidade dos filmes finos de (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> reconstruídos em água e dos filmes finos de (e) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (f) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (g) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (h) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> reconstruídos em etanol.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

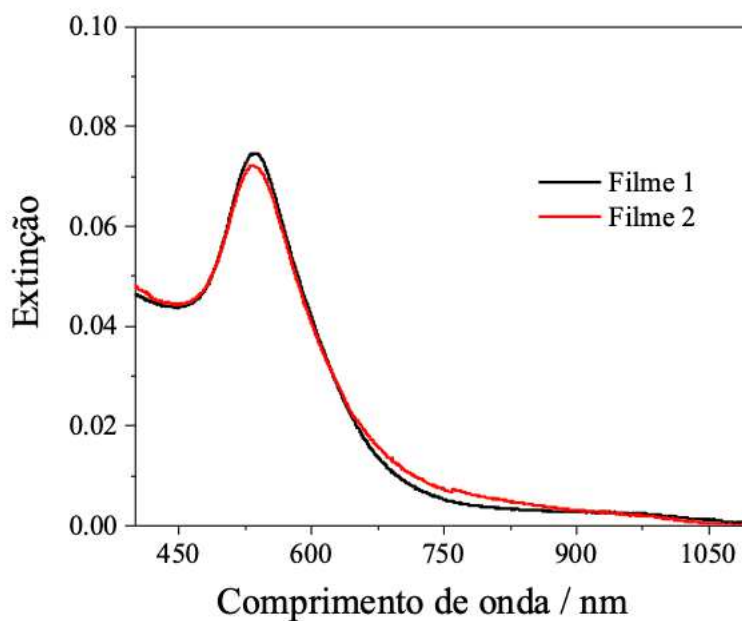
#### 4.9 TESTE DE REPRODUTIBILIDADE

É importante verificar a reprodutibilidade do substrato SERS para sua eventual aplicação como sensor, já que existe uma dependência da magnitude do sinal SERS com a geometria do sistema nanopartícula-molécula prova. Assim, foram utilizados dois filmes finos de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> – 6 h tratados com água para verificar a reprodutibilidade dos sistemas. Ao comparar os espectros UV-VIS apresentados na Figura 37, é possível observar



que o perfil espectral é semelhante, de forma que o arranjo das NPs no nanocompósito é reprodutível.

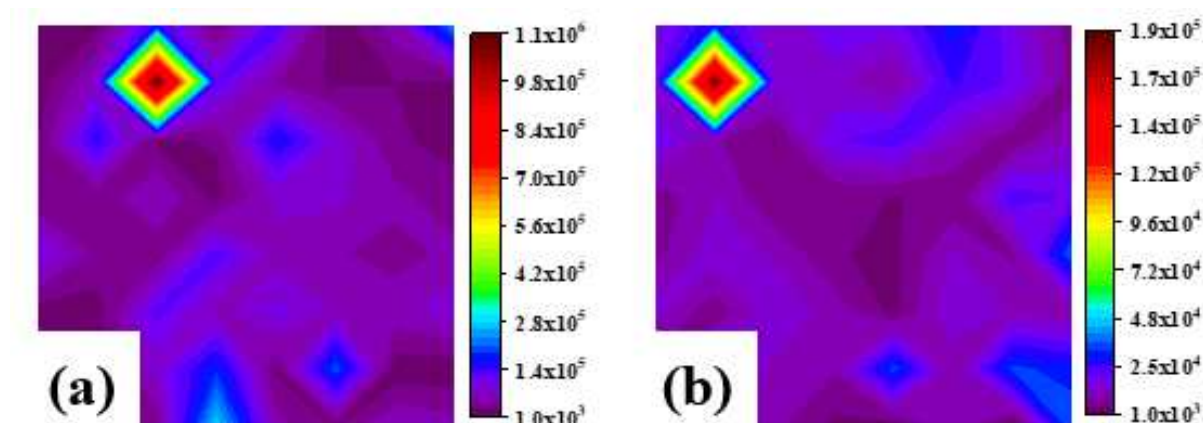
Figura 37 - Espectros UV-VIS de filmes finos de AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub> – 6 h reconstruídos em água.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na Figura 38 temos os mapeamentos SERS dos filmes finos de AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub> – 6 h tratados com água. É possível observar que os mapeamentos são bem semelhantes, corroborando o resultado obtido no UV-VIS. Assim, a metodologia proposta para a síntese de filmes finos de AuNP/PS-*b*-P2VP apresentada é reprodutível.

Figura 38 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP reconstruídos em  $\text{H}_2\text{O}$  e imersos em solução coloidal por 6 h; (a) filme 1 e (b) filme 2.

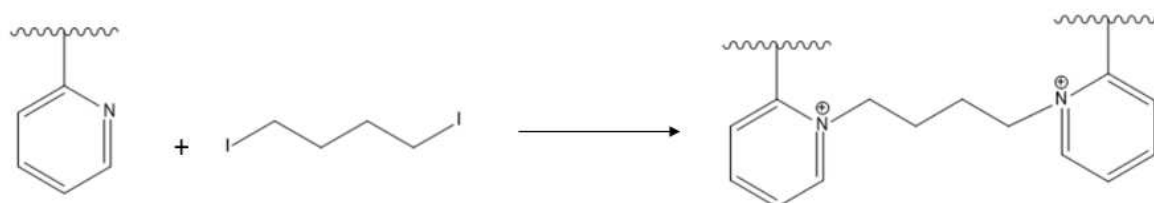


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.10 FILMES FINOS DE AuNP/PS-*b*-P2VP RETICULADOS

O processo de reticulação utilizando o 1,4-diiodobutano como agente reticulante foi realizado para impedir possíveis reconstruções dos filmes de PS-*b*-P2VP pela solução coloidal, e consequente mudança da morfologia final dos filmes de AuNPs/PS-*b*-P2VP. Durante a imersão do filme fino de PS-*b*-P2VP previamente tratado na solução de AuNPs, a presença da água pode difundir para os microdomínios de P2VP e ocasionar uma reestruturação da morfologia do filme para reduzir a energia superficial. Para assegurar que a morfologia dos filmes não será alterada durante o processo de adsorção das NPs, foi realizada uma reação de N-alkilação entre o DIB e os anéis piridínicos do P2VP, de forma a restringir a mobilidade do bloco P2VP (HAYWARD; CHMELKA; KRAMER, 2005). A Figura 39 apresenta uma representação do processo de reticulação.

Figura 39 - Representação do processo de reticulação entre cadeias poliméricas.

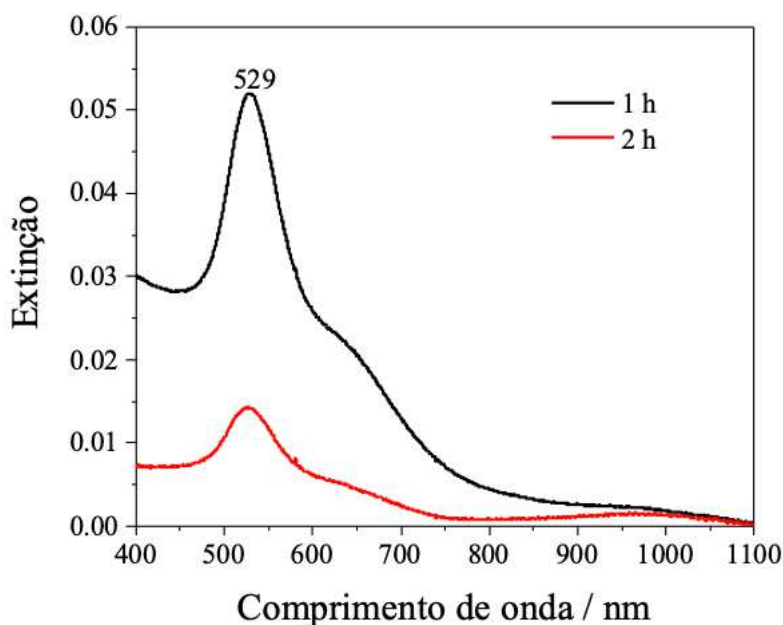


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.10.11 Estudo do tempo de exposição dos filmes finos ao agente reticulante

Primeiramente foi realizado um estudo do tempo de exposição AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> – 6 h tratados com água ao vapor de DIB. A figura 40 apresenta os espectros UV-VIS do filme de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> – 6 h, tratados com água com tempo de exposição de 1 h e 2 h ao vapor de DIB.

Figura 40 - Comparação entre os espectros UV-VIS do filme fino de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> – 6 h tratados com água com tempo de exposição de 1 h e 2 h ao agente reticulante.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

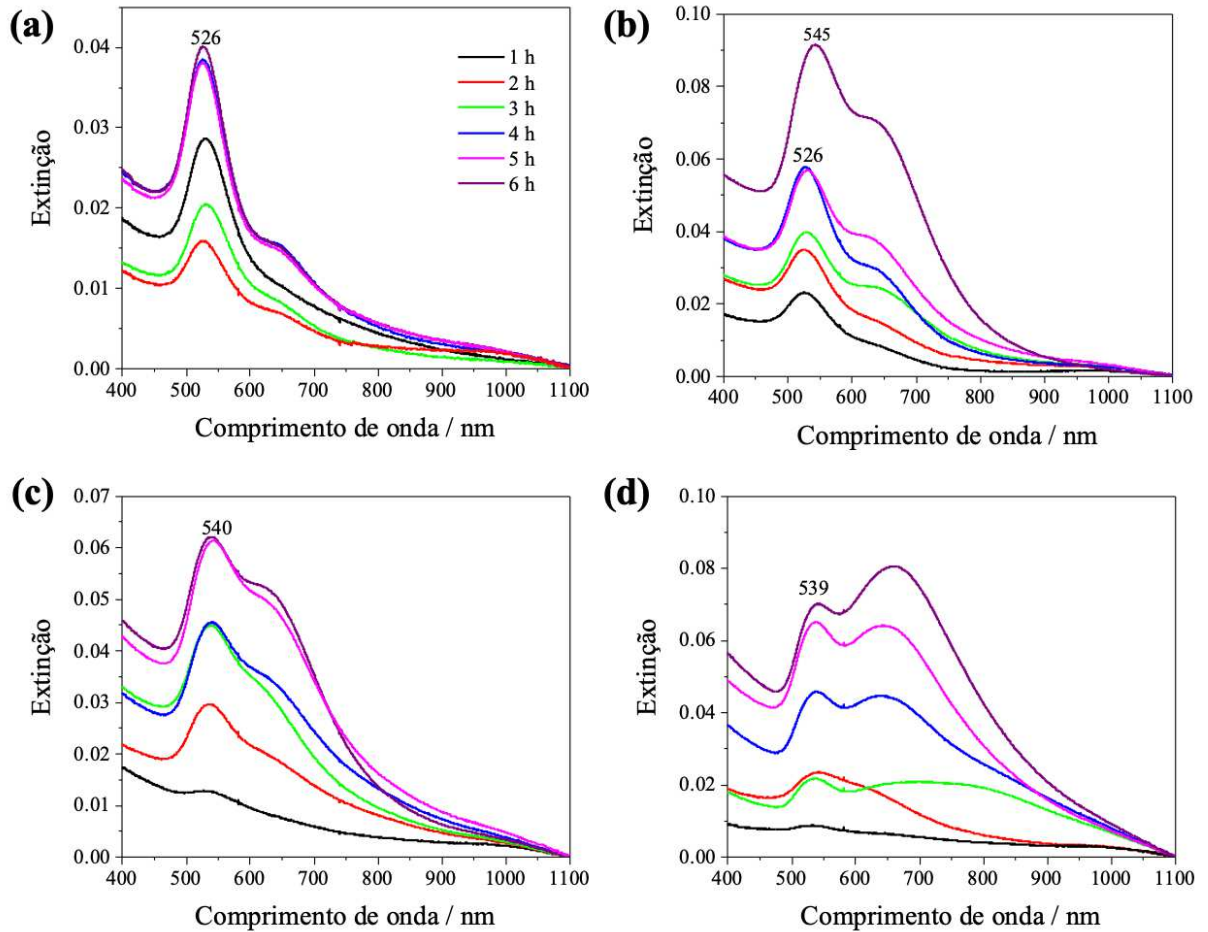
Como pode ser observado, há uma diminuição significativa na intensidade da banda de absorção LSPR com o aumento do tempo de exposição do filme ao vapor de DIB. Esse resultado está relacionado ao processo de quaternização dos anéis piridínicos e a diminuição dos grupos de P2VP capazes de interagir com as AuNPs, de forma que há uma diminuição na concentração de NPs adsorvidas na superfície do filme.

#### 4.10.2 Filmes finos de AuNPs/PS-*b*-P2VP reconstruídos em água e reticulados

Na Figura 41 são apresentados os espectros de absorção no UV-VIS dos filmes finos de AuNP/PS-*b*-P2VP reticulados reconstruídos em água. Nesses espectros, nota-se que à medida que o tempo de imersão em solução coloidal aumenta, há um aumento na intensidade da banda de absorção. Essas mudanças espectrais também foram observadas para os filmes de AuNP/PS-*b*-P2VP reconstruídos em água sem reticulação (Figura 21). Porém com o processo de reticulação, observa-se o alargamento da banda ~ 533 nm e o aparecimento progressivo de uma segunda banda com o aumento da Mw do copolímero em maiores comprimentos de onda. Esse comportamento espectral é atribuído ao acoplamento plasmônico de NPs adjacentes, indicando a quaternização dos anéis piridínicos do bloco P2VP. Com a diminuição de P2VP livres disponíveis para interação, ocorre a formação de mais aglomerados de AuNPs.

É interessante observar a diminuição de intensidade da banda em 539 nm no espectro do filme fino de AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> – 3 h em relação à intensidade da banda referente à adsorção por 2 h (Figura 41d). Esse resultado pode ser explicado pelo aumento da banda com máximo de absorção em torno de 800 nm referente a AuNPs agregadas.

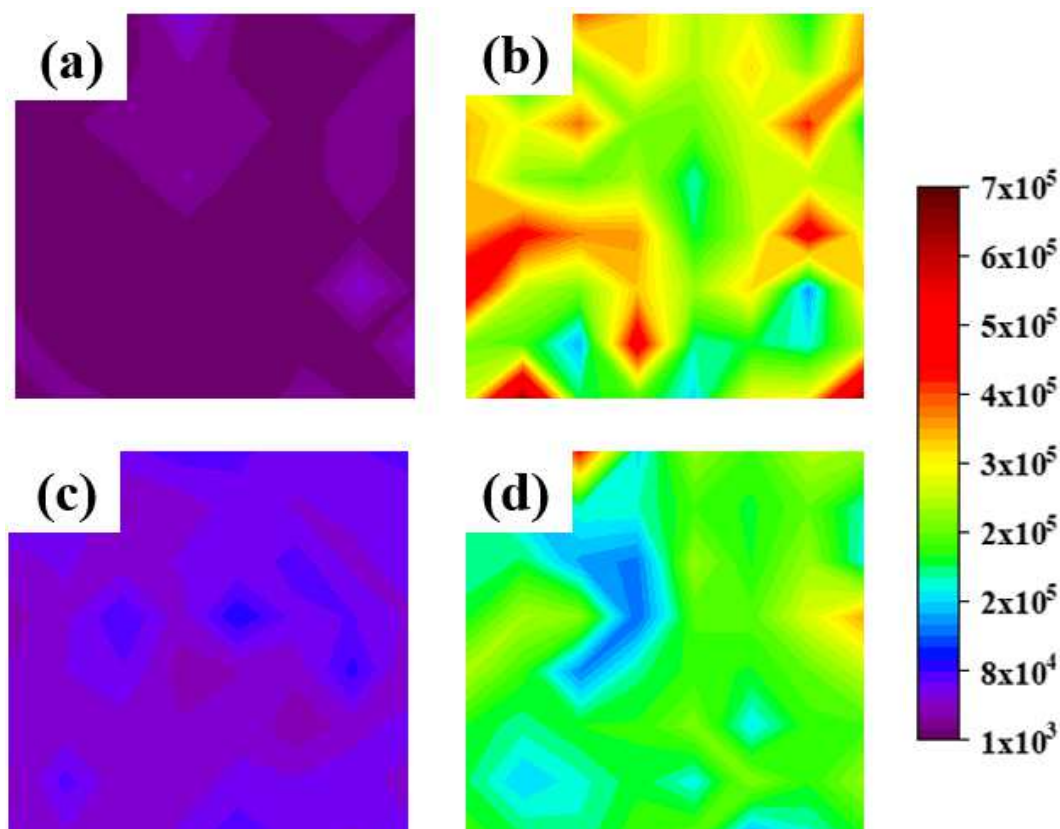
Figura 41 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> reconstruídos em água e reticulados.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 42 apresenta os mapeamentos SERS dos filmes finos de AuNP/PS-*b*-P2VP reticulados – 6 h reconstruídos em água. Pode ser observado que no conjunto de mapeamentos apresentados, o mapeamento que apresenta maior intensidade do sinal SERS é o da Figura 42b. Assim, relacionando a intensidade da banda de absorção em maiores comprimentos de onda observado nos espectros UV-VIS com a intensidade do sinal SERS, verifica-se que o sinal SERS aumenta na seguinte ordem: AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> < AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> < AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> < AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>.

Figura 42 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP reconstruídos em  $\text{H}_2\text{O}$  e reticulados: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>.

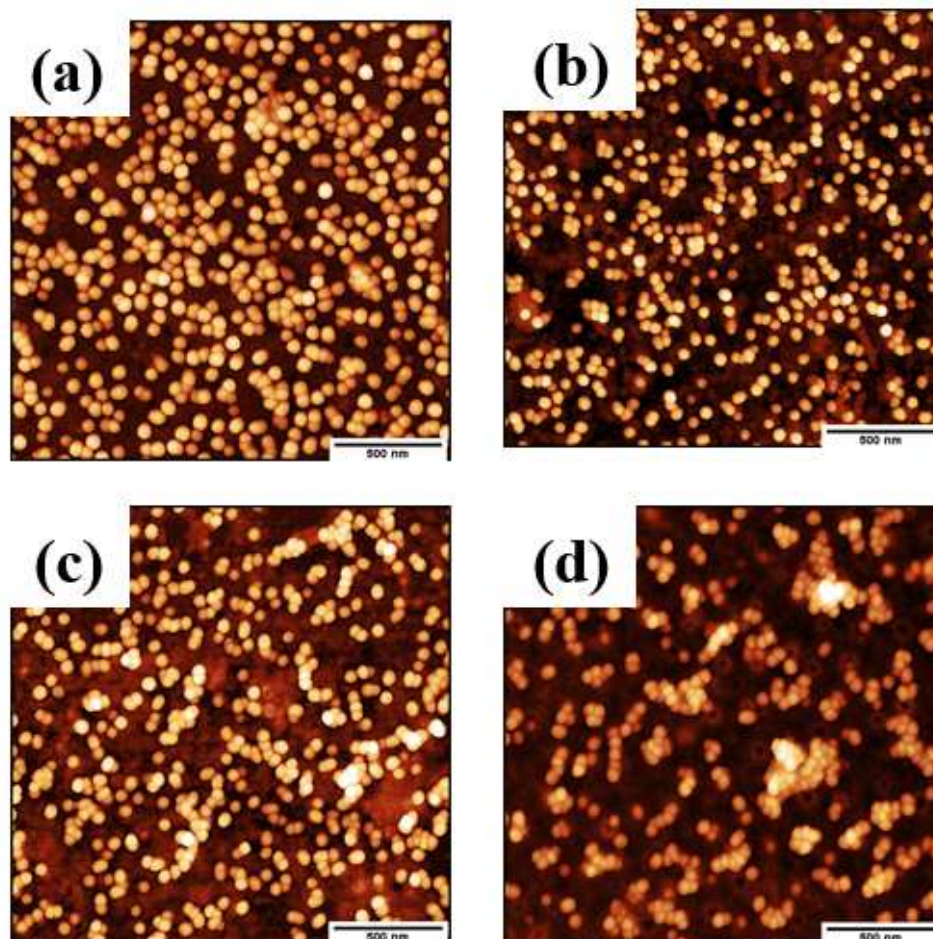


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para investigar como o processo de reticulação afeta a organização das nanopartículas, foram obtidas imagens de microscopia de força atômica (AFM) dos filmes imersos em solução coloidal por um período de 6 horas. A Figura 43 apresenta essas imagens, tem-se que as nanopartículas estão mais aglomeradas quando comparadas aos filmes sem o processo de reticulação, como ilustrado na Figura 21. Essa observação é consistente com os resultados obtidos nos espectros de absorção UV-VIS (Figura 41), demonstrando a influência do processo de reticulação na organização das nanopartículas nos filmes.



Figura 43 - Imagens topográficas dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP reconstruídos em água e reticulados (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.



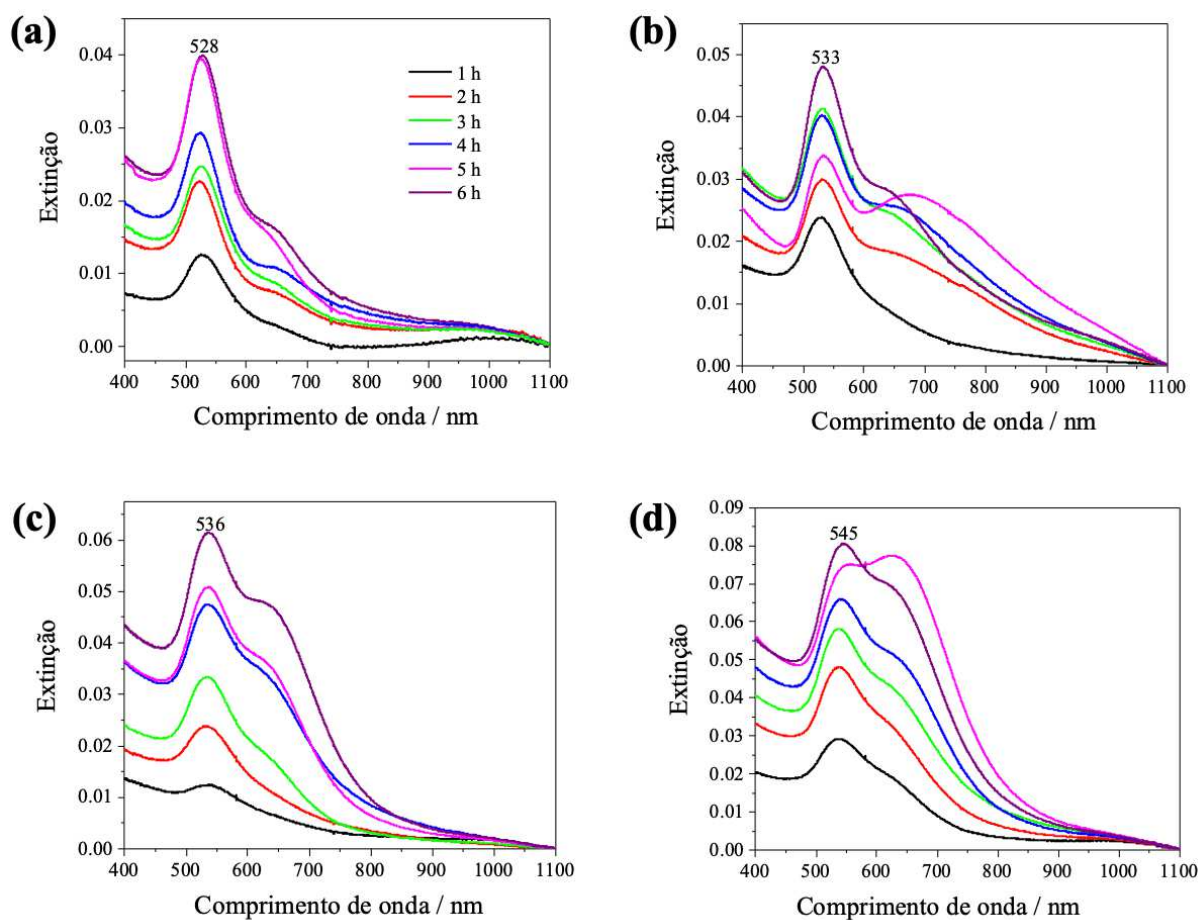
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.10.3 Filmes finos de AuNPs/PS-*b*-P2VP reconstruídos em etanol e reticulados

Os espectros UV-VIS dos filmes finos de AuNPs/PS-*b*-P2VP reconstruídos em etanol reticulados são mostrados na Figura 43. Comparando-se série de espectros apresentada na Figura 44 e os espectros mostrados na Figura 26, que são filmes finos em que se utilizou o etanol para a reorganização do filme polimérico, observa-se o aparecimento de uma banda larga em maiores comprimentos de onda devido a formação de agregados de AuNPs que se formam durante ao processo de reticulação do filme polimérico. Além disso, comparando-se as intensidades da banda de absorção LSPR dos filmes não reticulados e reticulados, observa-se que há uma diminuição de absorção nos filmes reticulados, indicando que menos microdomínios de P2VP estão disponíveis para a adsorção das AuNPs. É importante mencionar

que não há diferença significativa entre as intensidades de absorção com o aumento da cadeia de P2VP, como observado nos espectros da Figura 26, possivelmente devido ao processo de quaternização dos nitrogênios.

Figura 44 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> reconstruídos em etanol e reticulados.



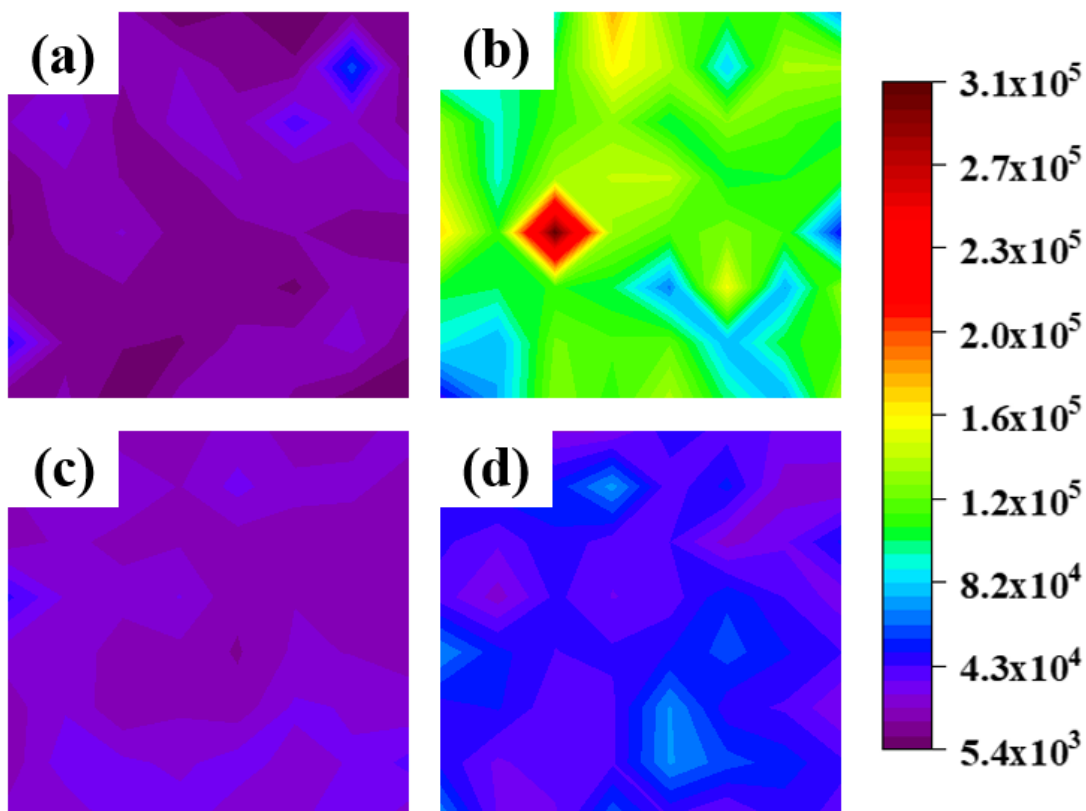
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 45 apresenta os mapeamentos SERS dos filmes finos de AuNP/PS-*b*-P2VP - 6 h reconstruídos em etanol reticulados. Pode-se observar que o mapeamento que possui maior intensidade de sinal SERS é referente ao filme fino de AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub> - 6 h. Este resultado destaca a relevância da distribuição das nanopartículas no filme. Apesar de o filme produzido com o polímero PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> (Figura 45d) apresentar a maior intensidade de



extinção (Figura 45d), o filme AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub> (Figura 45b) exibe aglomerados mais uniformemente distribuídos, o que resulta em uma maior intensificação do sinal nesse caso.

Figura 45 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP reconstruídos em etanol e reticulados: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

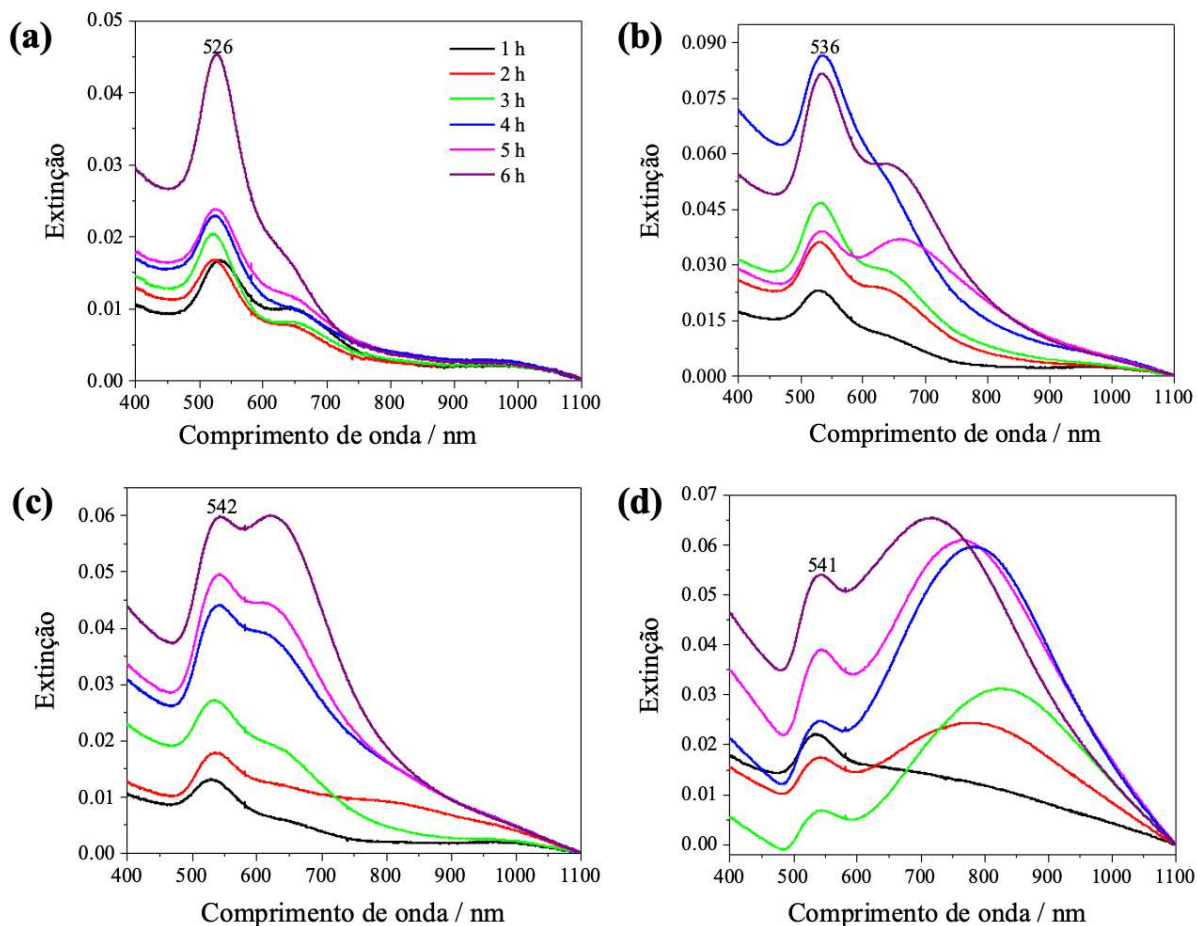
#### 4.10.4 Filmes finos de AuNPs/PS-*b*-P2VP reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno e reticulados

A Figura 46 mostra os espectros UV-VIS dos filmes finos de AuNPs/PS-*b*-P2VP reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno reticulados. A Figura 36a apresenta a série de espectros UV-VIS (1 a 6 h) para os filmes finos de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, onde pode ser observado o aumento da extinção em 526 nm com o aumento do tempo de imersão na solução coloidal e o aparecimento de ombro em maiores comprimentos de onda referente ao acoplamento plasmônico. Comparando-se os espectros apresentados na Figura 46, observa-se

que com o aumento da cadeia de P2VP, a banda em maiores comprimentos de onda aumenta de intensidade. É interessante destacar que na Figura 46b, a banda referente ao filme AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub> – 4 h é a que possui maior extinção. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que nos filmes de 5 h e 6 h a banda em torno de 680 nm é mais intensa do que no filme de 4 h, indicando que agregados maiores são formados para tempos acima de 4 h. Outro resultado importante é referente aos filmes de AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>, onde as bandas maiores comprimentos de onda são mais intensas que as bandas em 541 nm, demonstrando que nesses filmes finos as AuNPs se encontram majoritariamente depositadas em aglomerados.

Comparando-se os espectros UV-VIS apresentados na Figura 46 com a série de espectros UV-VIS apresentada na Figura 30, observa-se que a banda referente ao plasmon de superfície de AuNPs isoladas é mais intensa nos filmes finos que passaram pelo processo de reticulação, indicando que nesses filmes mais AuNPs encontram-se adsorvidas isoladamente. Como o processo de reticulação diminui o número de moléculas de P2VP capazes de interagir com as AuNPs, espera-se que nesses filmes menos nanopartículas sejam adsorvidas sobre o filme, de maneira que a banda referente à nanopartículas isoladas é mais intensa.

Figura 46 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno e reticulados.

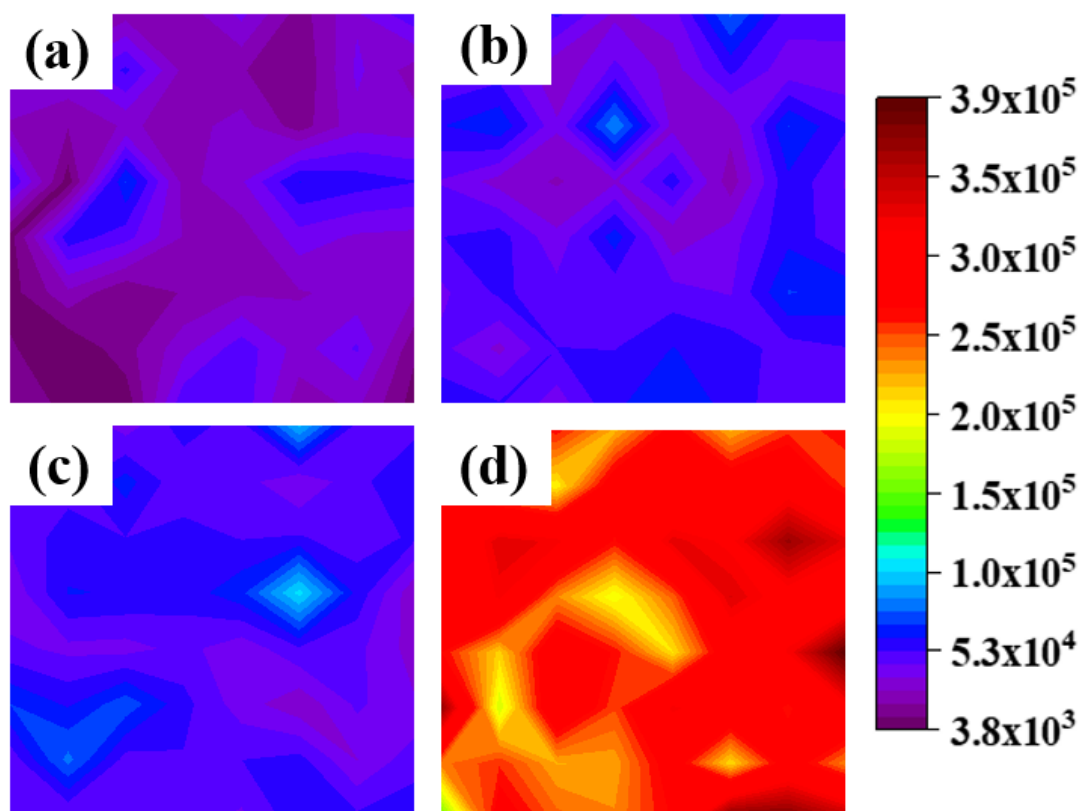


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os mapeamentos SERS dos filmes finos de AuNPs/PS-*b*-P2VP, reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno reticulados, são mostrados na Figura 47. Como pode ser observado, o mapeamento SERS de maior intensidade é o referente ao filme fino AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> – 6 h. Esse resultado corrobora o que foi observado nos espectros UV-VIS (Figura 46), uma vez que os filmes finos de AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> são aqueles que apresentam a banda referente ao acoplamento plasmônico mais intensa e como já foi apontado a presença de mais aglomerados levam à formação de mais *hot spots*.

Comparando os mapeamentos SERS apresentados nas Figuras 32 e 47, pode-se observar que os filmes finos após o processo de reticulação possuem o sinal SERS mais uniforme. Esse resultado está de acordo com o que foi observado nos espectros UV-VIS mostrados na Figura 46, ou seja, nesses filmes mais AuNPs se encontram adsorvidas isoladamente.

Figura 47 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP reconstruídos em atmosfera de THF/Tolueno e reticulados: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.



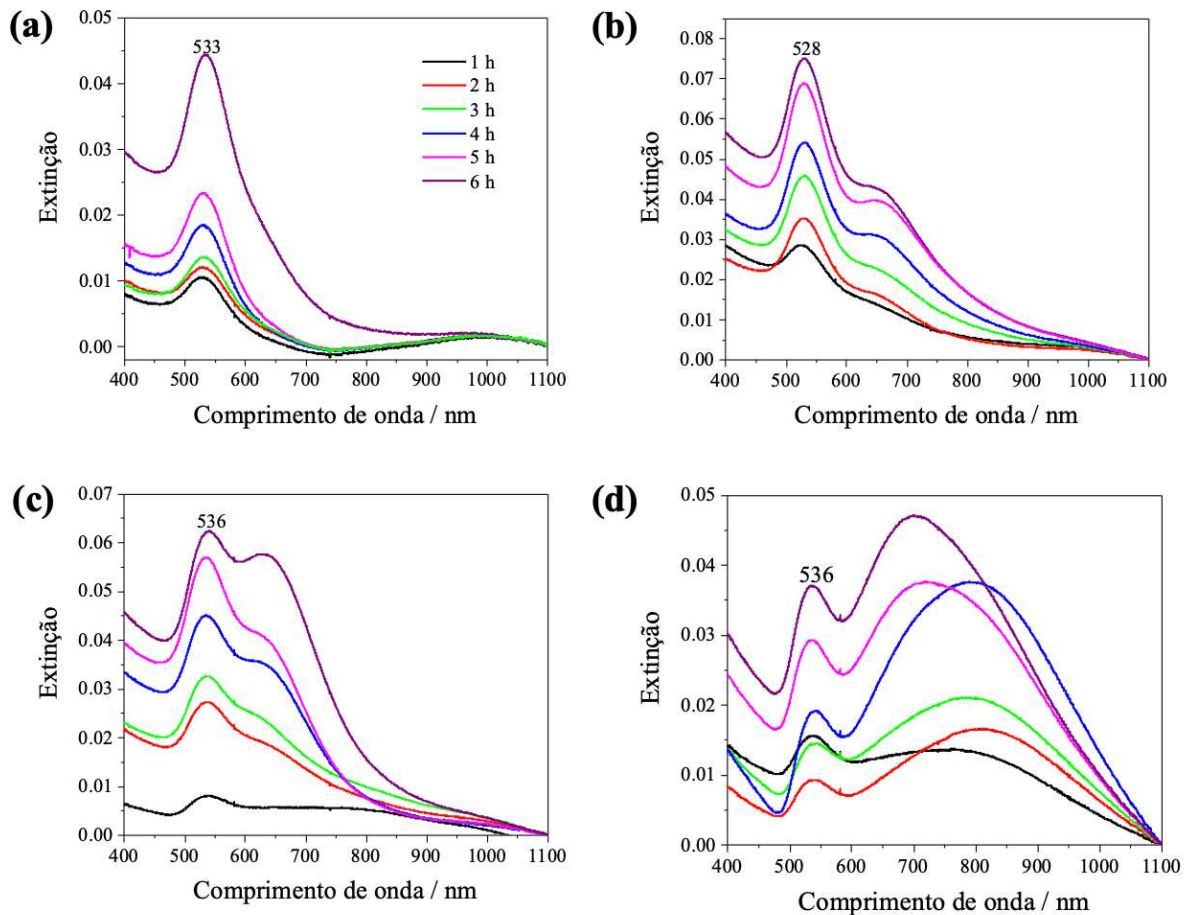
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.10.5 Filmes finos de AuNPs/PS-*b*-P2VP reconstruídos termicamente e reticulados

A Figura 48 apresenta os espectros UV-VIS dos filmes finos de AuNPs/PS-*b*-P2VP reconstruídos termicamente e reticulados. O aumento da banda em maiores comprimentos de onda pode ser observado com o aumento da cadeia de P2VP, indicando que os filmes finos de AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> são aqueles que apresentam a maior quantidade de aglomerados.

A análise comparativa entre os espectros observados na Figura 33 com os apresentados na Figura 48, indica que nos filmes que sofreram o processo de reticulação, verifica-se uma maior presença de AuNPs adsorvidas de forma isolada. Esse resultado é contrário ao esperado, uma vez que nesse processo, menos P2VP estão disponíveis para interagir com as AuNPs, de maneira que era esperado a adsorção na forma de aglomerados.

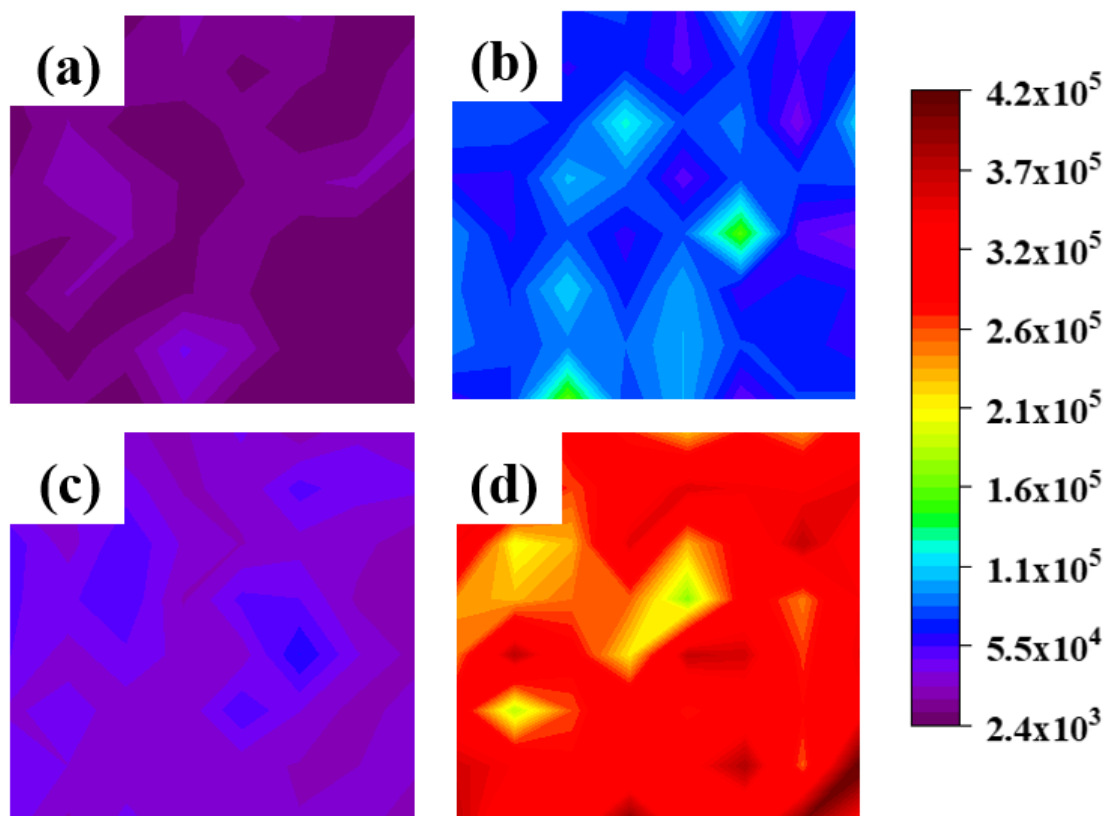
Figura 48 - Espectros UV-VIS dos filmes de (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-b-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-b-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-b-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> reconstruídos termicamente e reticulados.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os mapeamentos SERS dos filmes finos de AuNPs/PS-*b*-P2VP reconstruídos termicamente e reticulados são apresentados na Figura 49. Comparando-se os mapeamentos apresentados, temos que aquele que possui maior intensidade de sinal SERS é o referente ao filme fino de AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>, o que está de acordo com o que foi observado nos espectros UV-VIS da Figura 48, já que este filme fino é o que apresenta a banda referente ao acoplamento plasmônico mais intenso.

Figura 49 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-*b*-P2VP reconstruídos termicamente e reticulados: (a) AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub>, (b) AuNP/PS<sub>281</sub>-*b*-P2VP<sub>157</sub>, (c) AuNP/PS<sub>389</sub>-*b*-P2VP<sub>381</sub> e (d) AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub>.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

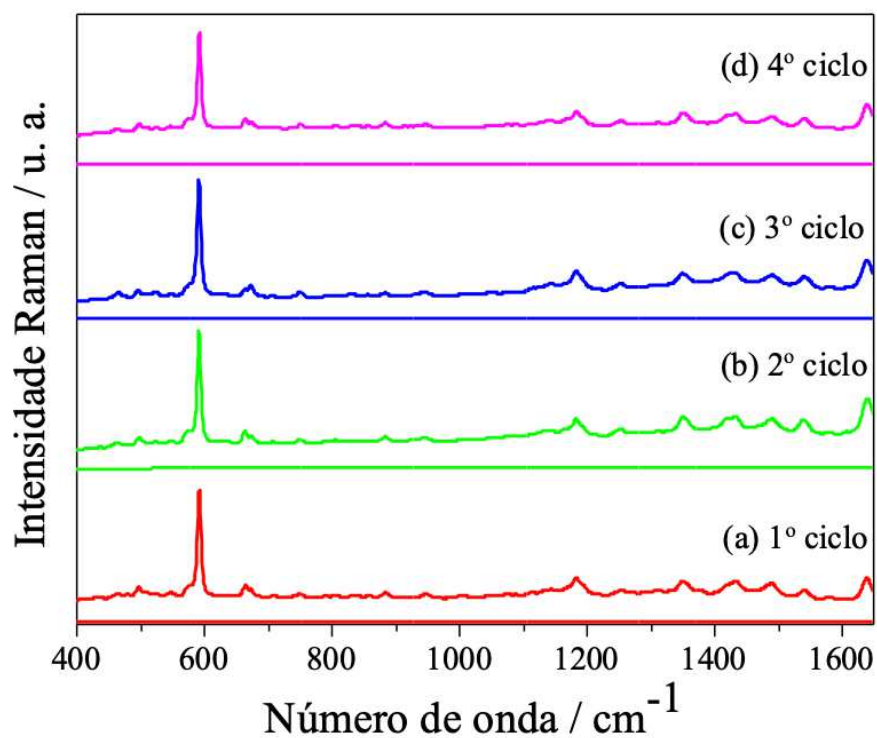
#### 4.11 AVALIAÇÃO DO AUNP/PS<sub>1250</sub>-B-P2VP<sub>1285</sub> COMO SUBSTRATO SERS REUTILIZÁVEL

A capacidade de reutilização dos substratos SERS é de suma importância nas aplicações práticas da espectroscopia SERS, pois torna as análises mais econômicas e sustentáveis. Assim, foi analisada a capacidade de reutilização do nanocompósito AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> tratado em água através da fotocatalisação na degradação de corantes utilizando como molécula prova o azul do Nilo e Rodamina 6G na concentração de  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

##### 4.11.1 Avaliação da reutilização do substrato SERS AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> usando o corante azul do Nilo como molécula prova

Para testar viabilidade de reutilização do filme AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>, o substrato foi imerso na solução do corante azul do Nilo, permitindo a adsorção das moléculas sobre as nanopartículas. O espectro SERS médio resultante desse processo é apresentado na Figura 50a, onde é possível observar a intensificação do sinal Raman do corante, com destaque para a banda característica em 594 cm<sup>-1</sup>. Em seguida, o filme foi exposto à radiação UV por um período de 6 horas e posteriormente foram feitas medidas Raman. A exposição à radiação UV induz a fotocatalise plasmônica para a degradação do corante. A Figura 50a apresenta o espectro Raman médio do filme utilizado como substrato SERS após a exposição à radiação UV, no qual nenhuma banda do corante é observada. Esse resultado indica a ocorrência de fotodegradação do adsorbato. Para demonstrar a reutilização desses substratos foram realizados 4 ciclos de imersão do substrato na solução de corante, medidas Raman e fotodegradação (Figura 50a-d). Como pode-se observar, após cada ciclo a molécula do corante é completamente degradada, demonstrando a eficácia do processo de fotodegradação catalisado pelas nanopartículas de ouro.

Figura 50 - Monitoramento dos espectros Raman médios ( $n = 100$ ) da molécula de prova ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) após cada ciclo de adsorção e degradação por fotocatalise plasmônica.

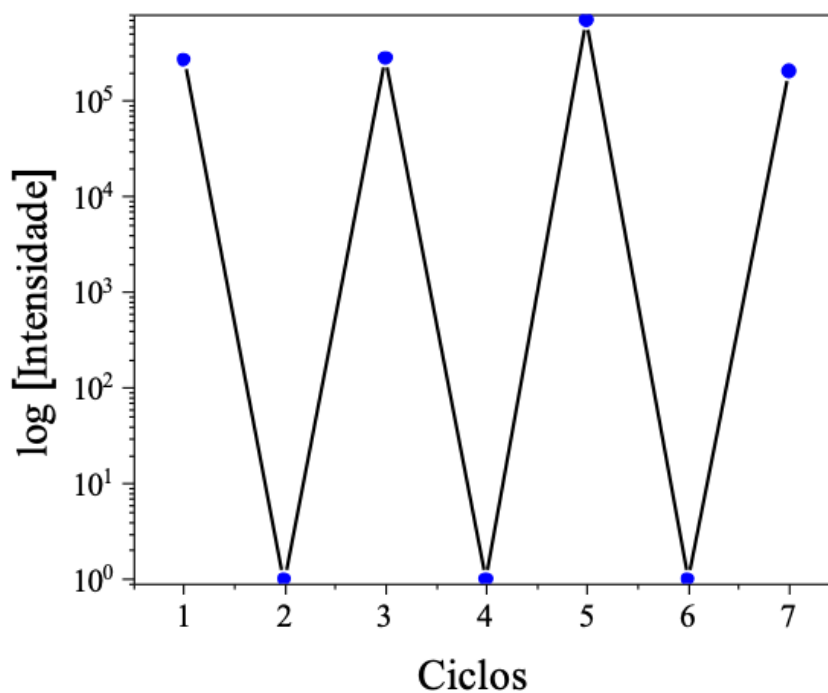


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O gráfico do log (intensidade) *versus* número de ciclos apresentado na Figura 51 demonstra que após cada ciclo o sinal SERS do corante apresenta uma intensidade comparável à anterior, indicando que o substrato mantém sua capacidade de intensificar o sinal Raman mesmo após vários ciclos de utilização e limpeza do substrato. Esse resultado evidencia possibilidade de reuso e estabilidade do substrato.



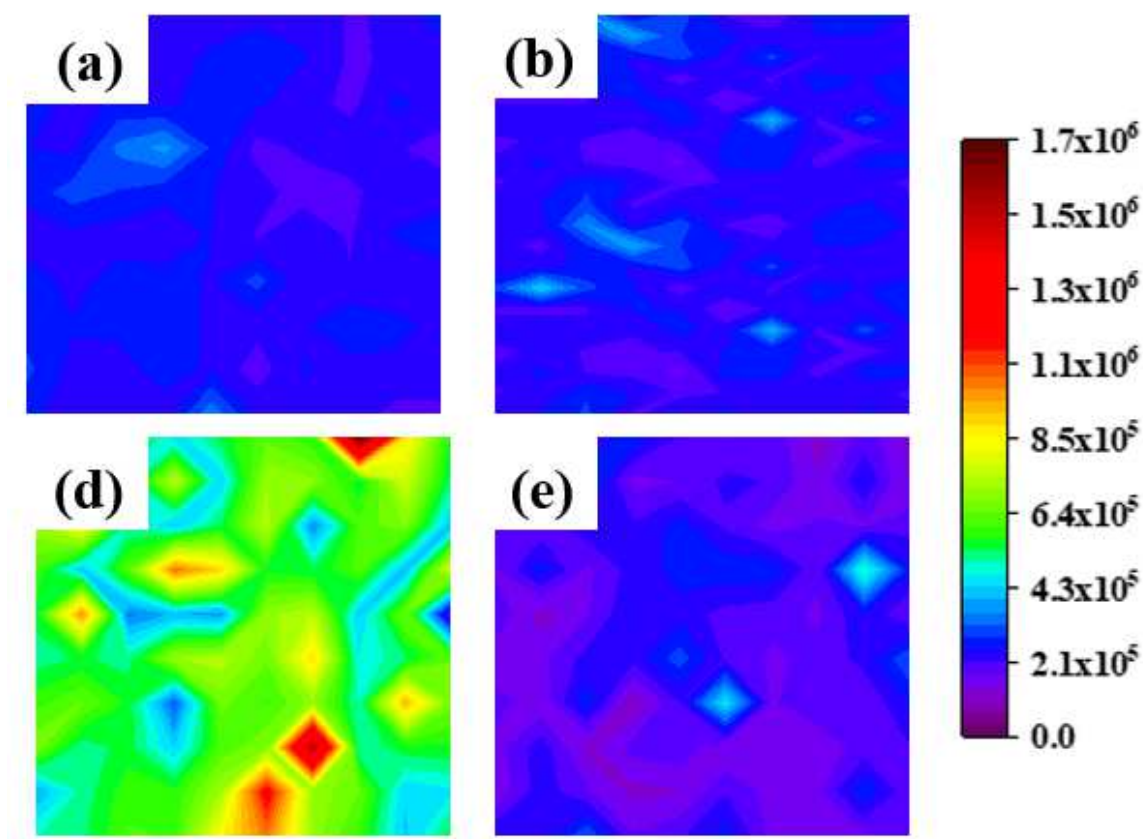
Figura 51 - Resposta SERS (banda em  $594\text{ cm}^{-1}$ ) após cada ciclo de adsorção do corante e degradação por fotocatalise plasmônica.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 52 apresenta os mapeamentos SERS da banda em  $592\text{ cm}^{-1}$  referentes a cada etapa de adsorção do corante no nanocompósito. É possível observar que o sinal SERS está uniformemente distribuído por toda a área analisada, indicando uma adsorção homogênea do corante. Além disso, mesmo após 4 ciclos de degradação, o substrato permanece estável.

Figura 52 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $594 \text{ cm}^{-1}$  do NB dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP após imersão no corante: (a) 1º ciclo, (b) 2º ciclo, (c) 3º ciclo e (d) 4º ciclo .

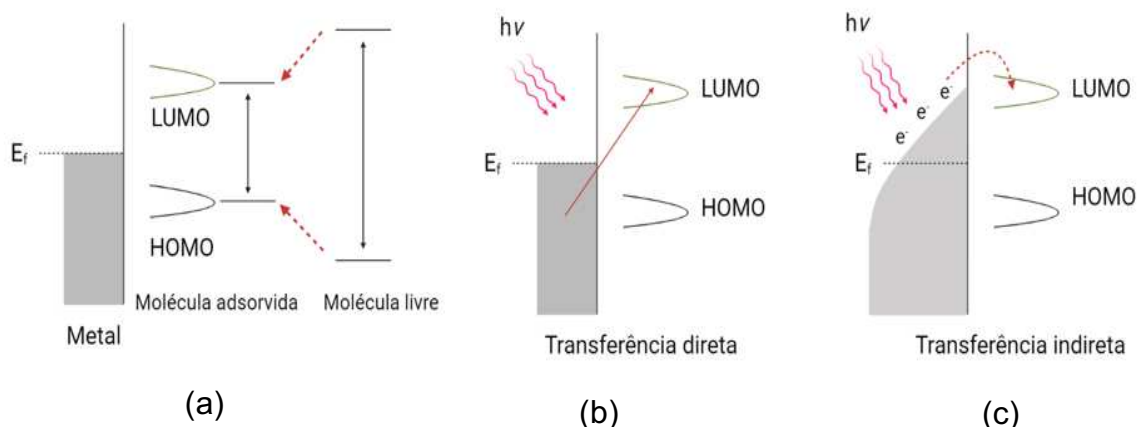


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Apesar de ainda não se ter um completo entendimento do mecanismo de catálise plasmônica, acredita-se que o fenômeno de LSPR permite que as nanopartículas metálicas colem a energia da luz na região do UV-visível. Essa energia é concentrada perto da superfície da nanopartícula e por fim convertida em pares de elétron-buraco excitados (ASLAM et al., 2018). Isso possibilita a transformação de moléculas quimicamente adsorvidas em suas superfícies, seja pela formação ou quebra de ligações, em condições moderadas. Para compreender a atividade catalítica das nanopartículas, é essencial compreender que, quando uma molécula está quimicamente adsorvida na superfície de uma nanopartícula metálica, podem ser formados estados híbridos entre o metal e o adsorbato (Figura 53a). Esse fenômeno resulta em uma diminuição significativa do intervalo de energia entre o orbital molecular mais alto ocupado (HOMO) e o orbital molecular mais baixo não ocupado (LUMO), em comparação com a molécula livre (DONG et al., 2023).

Dessa maneira, existem dois mecanismos propostos para a transferência de carga das nanopartículas para a molécula adsorvida: a transferência direta e a transferência indireta. No mecanismo de transferência direta, o processo de decaimento do LSPR resulta na transferência direta de um elétron para o orbital não ocupado da molécula, com energia semelhante (Figura 53b). Por outro lado, no mecanismo de transferência indireta (Figura 53c), os elétrons quentes são inicialmente gerados na nanopartícula durante o processo de excitação dos elétrons de valência pela energia da luz incidente. Posteriormente, aqueles elétrons com energia apropriada são transferidos para o orbital LUMO da molécula por meio de espalhamento. Além disso, acredita-se que o aquecimento gerado pela oscilação da nuvem eletrônica acelere a reação, uma vez que induz a população de estados vibracionais excitados (CHRISTOPHER; XIN; LINIC, 2011; DA SILVA et al., 2022).

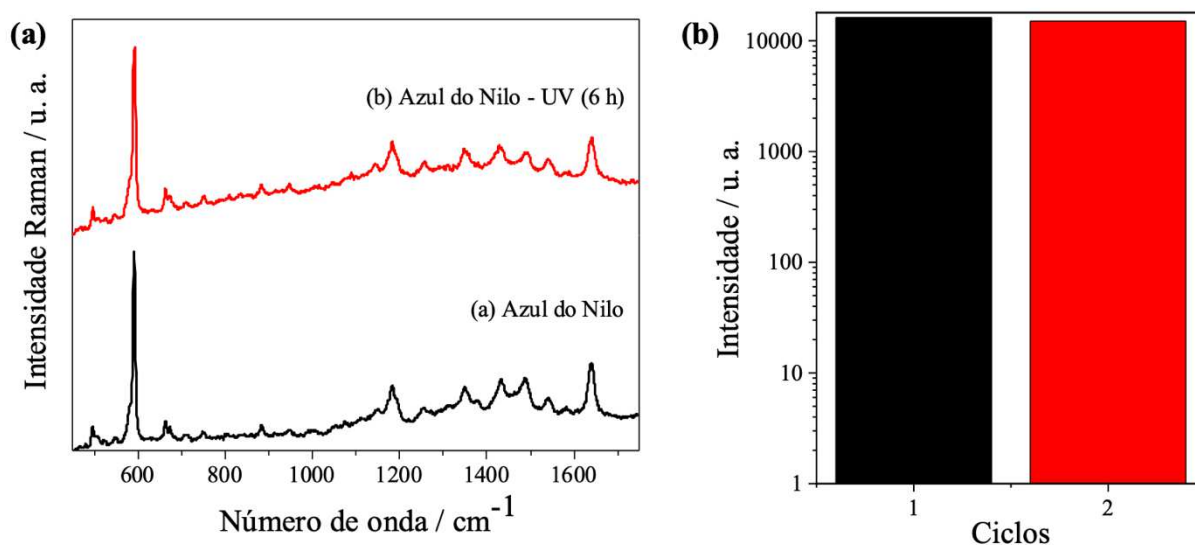
Figura 53 - (a) Hibridização entre os orbitais do metal e da molécula adsorvida; (b) transferência direta e (c) indireta de elétrons quentes do metal para a molécula.



Fonte: Adaptado de Dong et al. (2023).

Com o objetivo de verificar se as AuNPs estão efetivamente atuando como catalizadores na fotodegradação dos corantes pela luz UV, foi realizado o branco em que o corante Azul do Nilo depositado sobre uma lâmina de vidro limpa foi exposto à radiação UV por 6 horas. A Figura 54a traz os espectros SERS do corante antes e após a exposição à luz UV e na Figura 52b tem-se a comparação da intensidade da banda em  $594\text{ cm}^{-1}$ . É possível observar que não há uma redução significativa do sinal Raman após 6 horas de exposição à radiação UV, o que indica que o processo de degradação do corante é de fato catalisado pelas nanopartículas de ouro

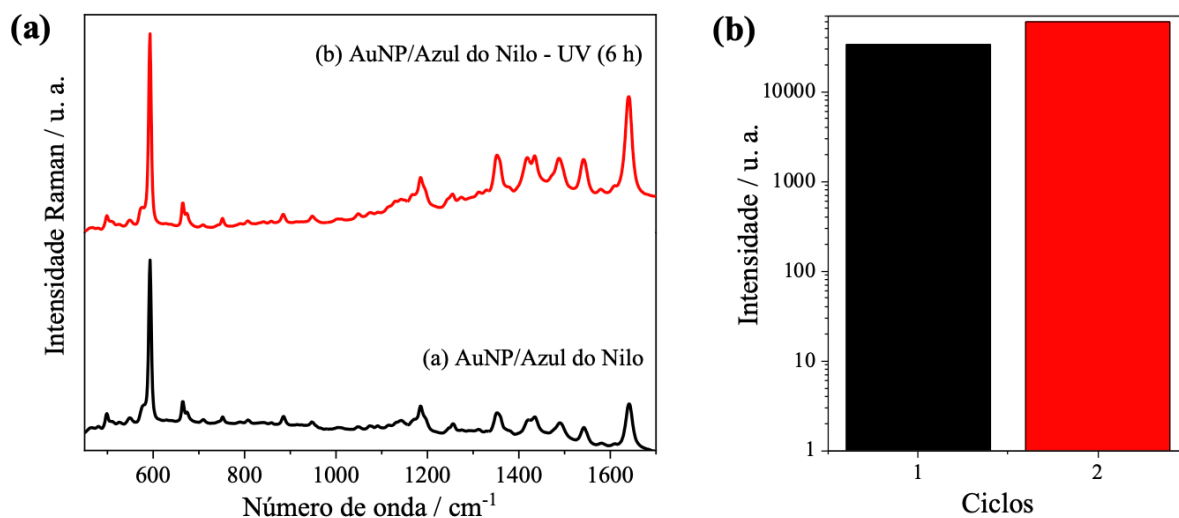
Figura 54 - (a) Espectros Raman e (b) gráfico comparativo das intensidades da banda em 594  $\text{cm}^{-1}$  das moléculas de azul do Nilo depositadas em uma lâmina de vidro.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Certas propriedades intrínsecas das nanopartículas influenciam diretamente na frequência do LSPR. Essas propriedades incluem o tamanho, a forma, a estrutura e a composição das nanopartículas, bem como a constante dielétrica do meio (STILES et al., 2008; WILEY et al., 2006). Com o objetivo de investigar o papel do substrato polimérico na fotocatalise plasmônica, o corante foi adsorvido diretamente em nanopartículas de ouro depositadas em um slide de vidro. A Figura 55 apresenta os espectros SERS do Azul do Nilo antes e depois da exposição à radiação UV. Nota-se que não houve diminuição do sinal, indicando que a organização das AuNPs sobre o filme polimérico influencia suas propriedades catalíticas. Esse efeito pode ser atribuído à amplificação do campo elétrico local que ocorre nas regiões de *hot spots* formadas na deposição organizada das nanopartículas.

Figura 54 - (a) Espectros SERS e (b) gráfico comparativo das intensidades da banda em 594  $\text{cm}^{-1}$  das moléculas de azul do Nilo adsorvidas em AuNPs depositas em uma lâmina de vidro.

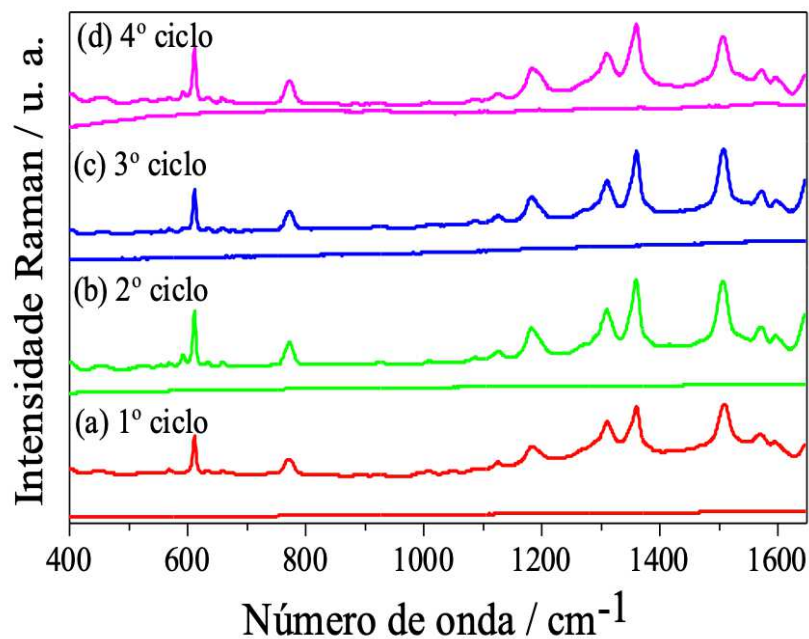


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.11.2 Avaliação da reutilização do substrato SERS AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> usando o corante rodamina 6G como molécula prova

Foi conduzido um experimento similar ao apresentado na seção 4.10.1, porém empregando como molécula prova o corante rodamina 6G na concentração de  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Novamente, observa-se que a intensificação do sinal Raman do corante após sua adsorção sobre o substrato e sua degradação após 6 horas de exposição do nanocompósito à radiação UV como mostrado na Figura 56. O reuso do substrato foi avaliado através da realização de 4 ciclos consecutivos de adsorção e degradação do corante, com monitoramento realizado por espectroscopia SERS, permitindo verificar a eficiência do nanocompósito após cada ciclo.

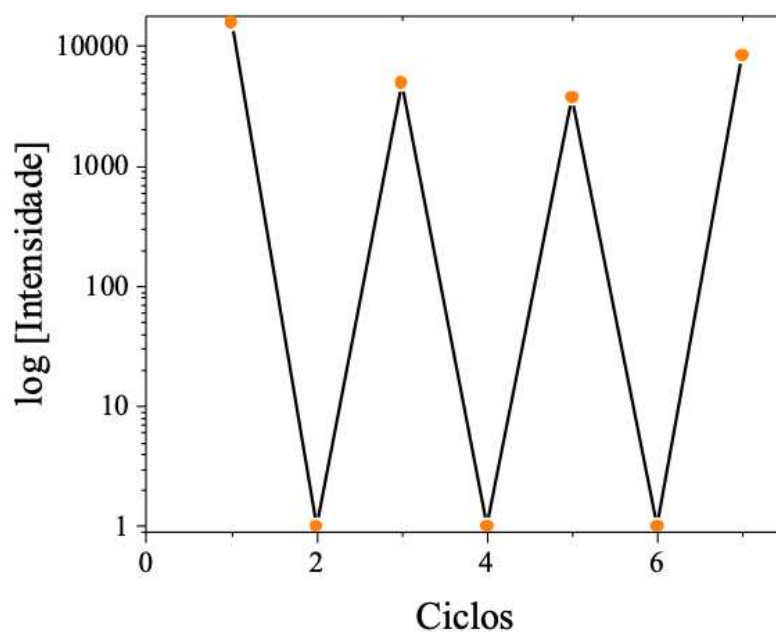
Figura 55 - Monitoramento dos espectros Raman médios ( $n = 100$ ) da molécula de prova ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) após imersão no corante: (a) 1º ciclo, (b) 2º ciclo, (c) 3º ciclo e (d) 4º ciclo .



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na Figura 57, o gráfico do logaritmo da intensidade em função do número de ciclos apresenta um comportamento semelhante ao observado na Figura 50. Após cada ciclo, é possível observar o desaparecimento do sinal SERS após a incidência da luz UV e, em seguida, com a imersão do substrato na solução do corante, novamente é observado a intensificação da banda em  $615 \text{ cm}^{-1}$ , característica da rodamina 6G. Esse resultado indica que, mesmo após vários ciclos de adsorção e degradação, o substrato mantém sua estabilidade.

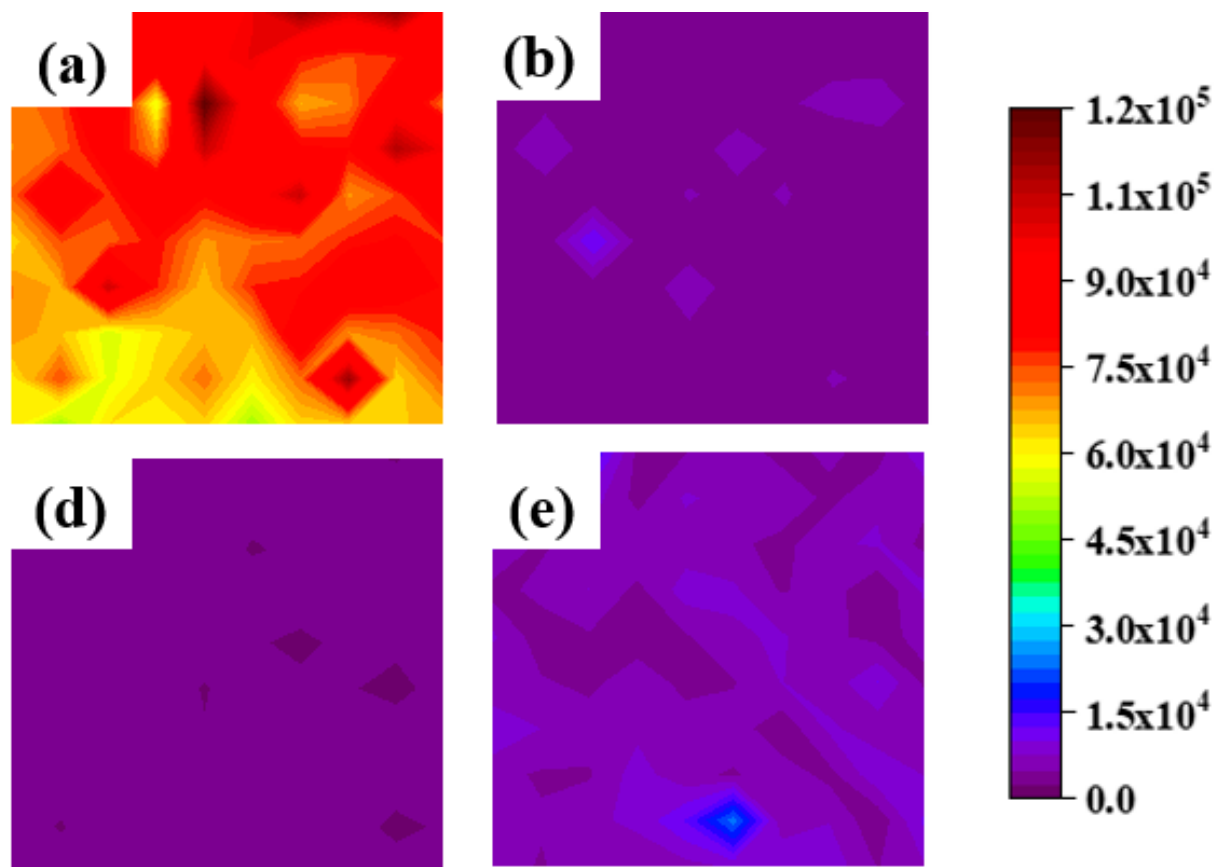
Figura 56 - Resposta SERS (banda em  $615\text{ cm}^{-1}$ ) após cada ciclo de adsorção do corante e degradação por fotocatalise plasmônica.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Além disso, foi realizado o mapeamento SERS da banda em  $615\text{ cm}^{-1}$  para cada ciclo de adsorção do corante sobre o substrato (Figura 58). É evidente que o sinal SERS está distribuído de forma uniforme por toda a área analisada, o que indica uma adsorção homogênea do corante, indicando que mesmo após 4 ciclos de adsorção e degradação, o substrato permanece estável.

Figura 57 - Mapeamento SERS  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  da banda em  $615 \text{ cm}^{-1}$  do R6G dos filmes finos de AuNPs em PS-b-P2VP após cada ciclo de fotodegração.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

É relevante ressaltar que a intensidade do sinal SERS da rodamina 6G é menor que do corante azul do Nilo. Esse efeito é atribuído à ressonância entre o azul do Nilo e a linha de excitação utilizada ( $\lambda_0 = 633 \text{ nm}$ ) na realização do mapeamento SERS (IZUMI; MOFFITT; BROLO, 2011). Contudo, foi demonstrado que os filmes de AuNPs/PS-b-P2VP podem ser utilizados na detecção das duas moléculas prova e pode ser reutilizado empregando a fotocatalise.



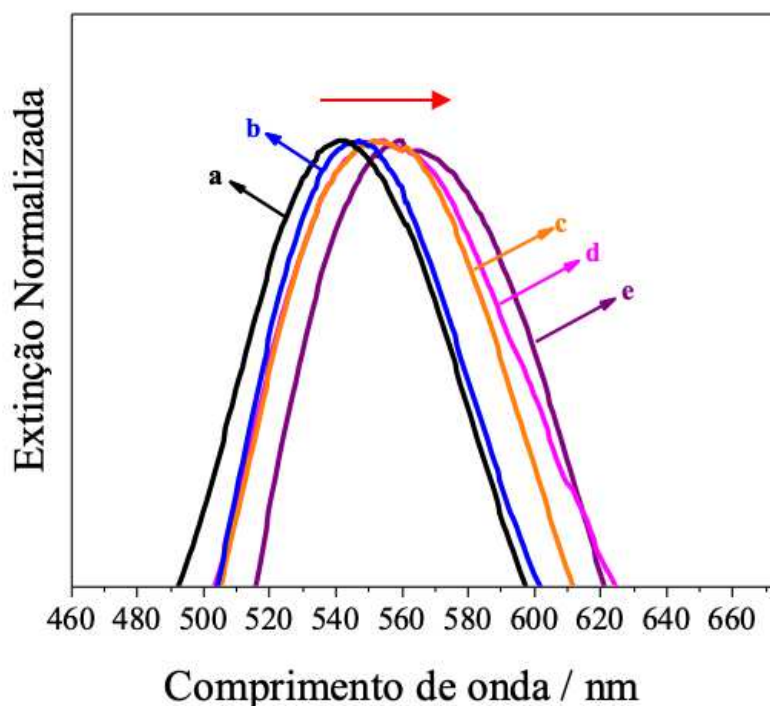
## 4.12 DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR UTILIZANDO NANOCOMPÓSITOS DE AUNPS/PS-B-P2VP

Os filmes PS-b-P2VP são sistemas que permitem o controle da deposição de AuNPs sobre sua superfície, são reprodutíveis e estáveis. Essas características tornam esses nanocompósitos altamente promissores para a construção de sensores/biossensores plasmônicos. Dentre os copolímeros avaliados nesse estudo, aquele com a maior massa molecular (PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>) apresentou as intensificações mais significativas do sinal SERS. Dessa maneira, este copolímero foi selecionado para o desenvolvimento de um sensor de detecção direta de biomoléculas através da espectroscopia SERS.

### 4.12.1 Preparação do Biossensor

A fabricação do biossensor para detecção do antígeno (IgG) foi obtida através da funcionalização dos filmes de AuNPs/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> a partir da adaptação do procedimento proposto por Suthanthiraraj e colaboradores (AUSTIN SUTHANTHIRARAJ; SEN, 2019). Os espectros UV-VIS normalizados de cada etapa da funcionalização são mostrados na Figura 59. A partir do monitoramento da posição do máximo absorção do LSPR ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), pode-se observar nos espectros que a cada modificação da superfície da nanopartícula há um deslocamento do  $\lambda_{\text{máx}}$  para maiores comprimentos de onda em relação ao espectro do filme de AuNPs/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> sem nenhuma modificação. Sabe-se que a posição do máximo absorção do LSPR ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) é afetado por mudanças no índice de refração local devido à ligação de moléculas à superfície das nanopartículas. Assim, cada etapa da funcionalização induz um ambiente dielétrico diferente na interface Au/ligante, levando ao deslocamento do  $\lambda_{\text{máx}}$ .

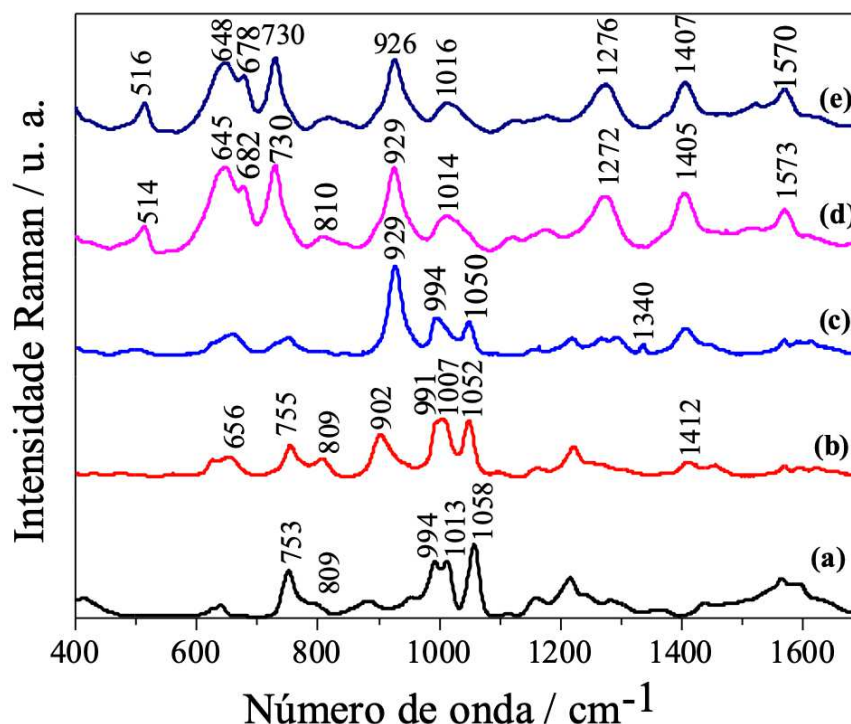
Figura 58 - Espectros UV-VIS de cada etapa de funcionalização do substrato de AuNPs/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>: (a) AuNPs/PS-b-P2VP; (b) AuNPs/PS-b-P2VP funcionalizado com 11-MUA/MPA; (c) AuNPs/PS-b-P2VP/ 11-MUA/MPA funcionalizado com EDC/NHS; (d) AuNPs/PS-b-P2VP / 11-MUA/MPA / EDC/NHS funcionalizado com anti-IgG e (e) sensor pronto exposto a 150 mg/mL de IgG.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 59 apresenta os espectros Raman médios do filme de AuNPs/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> e após cada etapa da funcionalização. O espectro SERS do biossensor após a interação com o analito (concentração de IgG = 150 µg/mL) também é mostrado na Figura 59. A presença das bandas características do 11-MUA em 656 cm<sup>-1</sup> devido ao  $\nu(\text{CS})$  e 902 cm<sup>-1</sup> relacionada ao modo  $\nu(\text{C-COOH})$  (Figura 59b) confirmam a modificação do substrato de AuNPs/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> com 11-MUA/MPA (MARQUES et al., 2018).

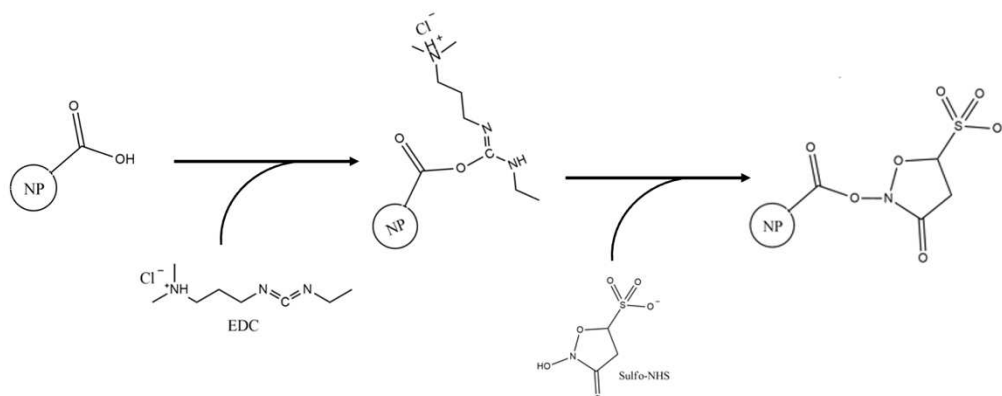
Figura 59 - Espectro SERS médio (n = 100 espectros) de cada etapa da funcionalização do substrato de AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> e detecção da interação anti-IgG/IgG: (a) AuNPs/PS-b-P2VP; (b) AuNPs/PS-b-P2VP funcionalizado com 11-MUA/MPA; (c) AuNPs/PS-b-P2VP/ 11-MUA/MPA funcionalizado com EDC/NHS; (d) AuNPs/PS-b-P2VP / 11-MUA/MPA / EDC/NHS funcionalizado com anti-IgG e (e) sensor pronto exposto a 150 µg/mL de IgG.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A ativação do grupo carboxila presente no 11-MUA foi realizada com o tratamento do substrato com EDC/NHS (Figura 60). A conversão do grupamento -COOH a um éster succínico permite a imobilização do anticorpo através de um ataque nucleofílico a partir dos grupos aminas presentes no aminoácido lisina que constitui as cadeias laterais do anticorpo, como demonstrado por Hibbert e colaboradores (CHON et al., 2010; HIBBERT; GOODING; EROKHIN, 2002). Após a ativação do grupo carboxila, observa-se o deslocamento da banda referente ao modo  $\nu(\text{C-COOH})$  para  $929 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 59c). Além disso, a presença dessa banda nos espectros SERS do anti-IgG (Figura 59d) e IgG (Figura 59e) pode estar relacionado ao grupo amina formado após a ligação covalente do anticorpo à superfície da AuNP.

Figura 60 - Ativação do grupo carboxila coordenado à superfície da NP.



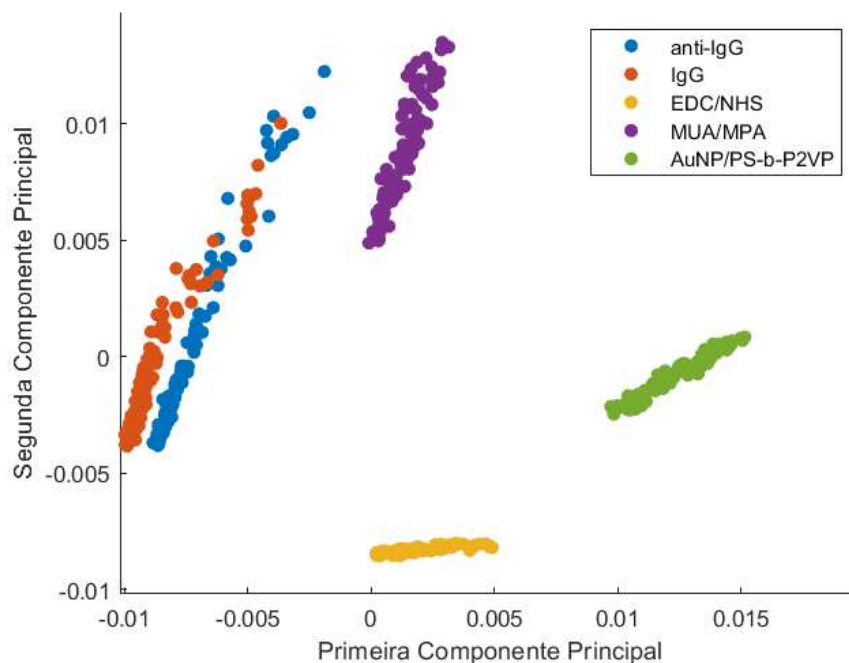
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Após a imobilização do anti-IgG, foi utilizado o BSA no intuito de bloquear qualquer região livre sobre a superfície da AuNP e impedir qualquer interação não específica. Tem-se que o BSA se liga espontaneamente à superfície da nanopartícula estabilizada por citrato através da interação eletrostática entre o citrato (negativo) e a carga positiva dos grupos lisina presentes no BSA.

As frequências típicas de proteínas estão usualmente relacionadas aos grupos funcionais nos aminoácidos, cadeia principal e laterais (ORTIZ-DOSAL et al., 2021). Dessa forma, é esperado que a interação entre o IgG e o anti-IgG imobilizado causem mudanças espectrais como por exemplo, mudanças nas intensidades relativas e deslocamentos das bandas. No entanto, ao comparar os espectros SERS médios do sensor antes e após o ensaio (Figura 59d e e), não é possível observar mudanças significativas. Isso se deve à distância entre a molécula analisada e a nanopartícula, que não permite uma alta intensificação do seu sinal SERS. Dessa forma que uma análise estatística mais sofisticada é necessária.

Para conseguir diferenciar os espectros antes e depois do imunoenensaio foi empregado o PCA. A Figura 61 mostra o gráfico de dispersão entre os componentes PC1 e PC2 obtido pela combinação de todos os espectros SERS de cada etapa da modificação (Figura 59). A partir do gráfico, é possível observar uma discriminação clara entre os dados relativos a cada funcionalização, porém observa-se uma sobreposição entre os escores relacionados ao substrato modificado com o anti-IgG e ao imunoenensaio.

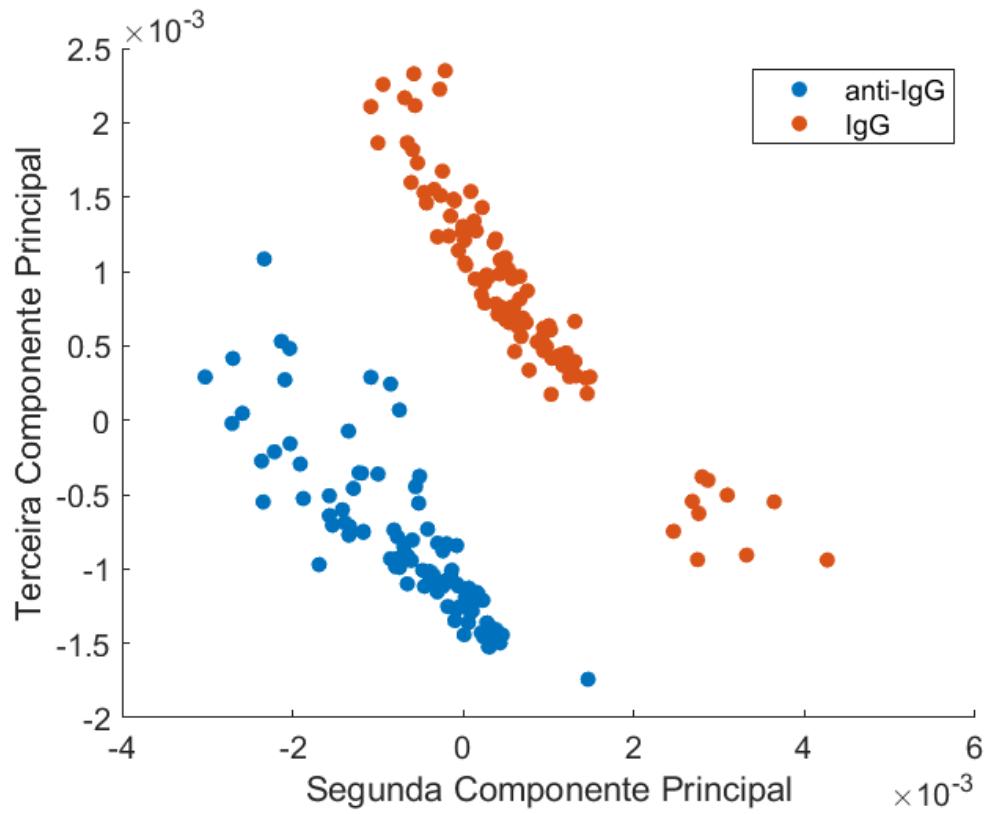
Figura 61 - Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC1 e PC2 das etapas de funcionalização e detecção do analito.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 62 traz o gráfico de dispersão dos componentes principais PC2 e PC3, que correspondem a 8,68% da variância total para os dados analisados (Apêndice A). Como pode ser observado temos uma melhor discriminação entre os dados relacionados ao sensor antes e depois do imunoensaio. Assim, empregando esse método é possível fazer a detecção qualitativa do analito.

Figura 62 - Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC2 e PC3 para uma melhor discriminação entre os dados do sensor antes e depois do imunensaio (concentração de IgG = 150 mg/mL).

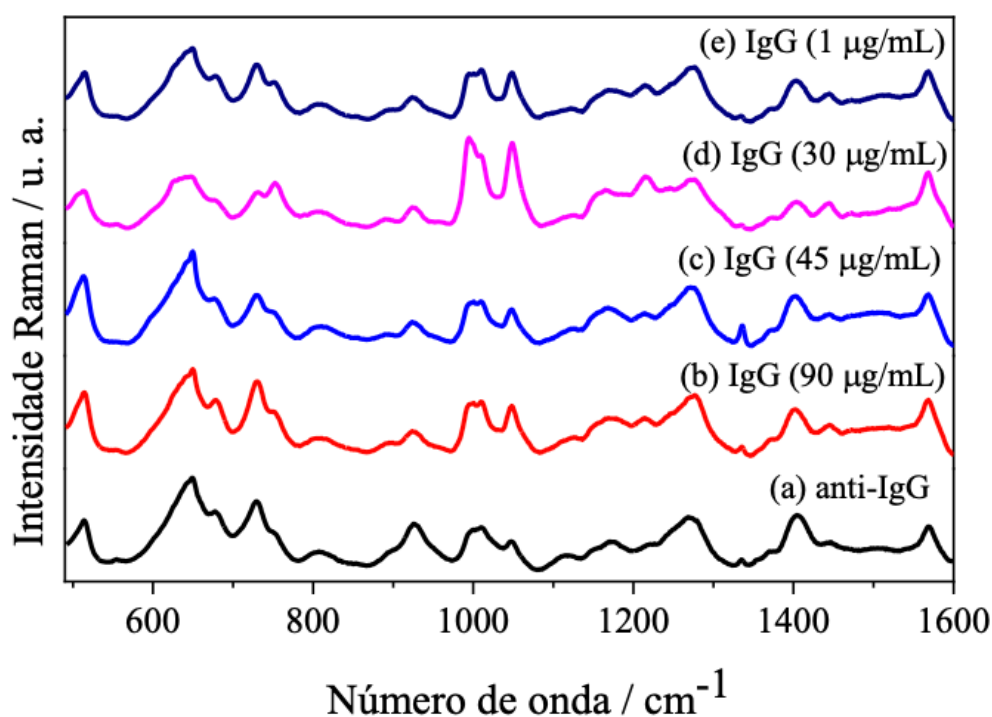


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.12.2 Detecção de diferentes concentrações de IgG

Após verificar que é possível utilizar o PCA para obter uma discriminação entre os espectros do sensor antes e após o imunoenensaio, o próximo passo é verificar a possibilidade de detecção de diferentes concentrações do IgG. Assim, o sensor foi incubado em soluções de IgG com diferentes concentrações (1 – 90  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido de mapeamentos SERS (Figura 63).

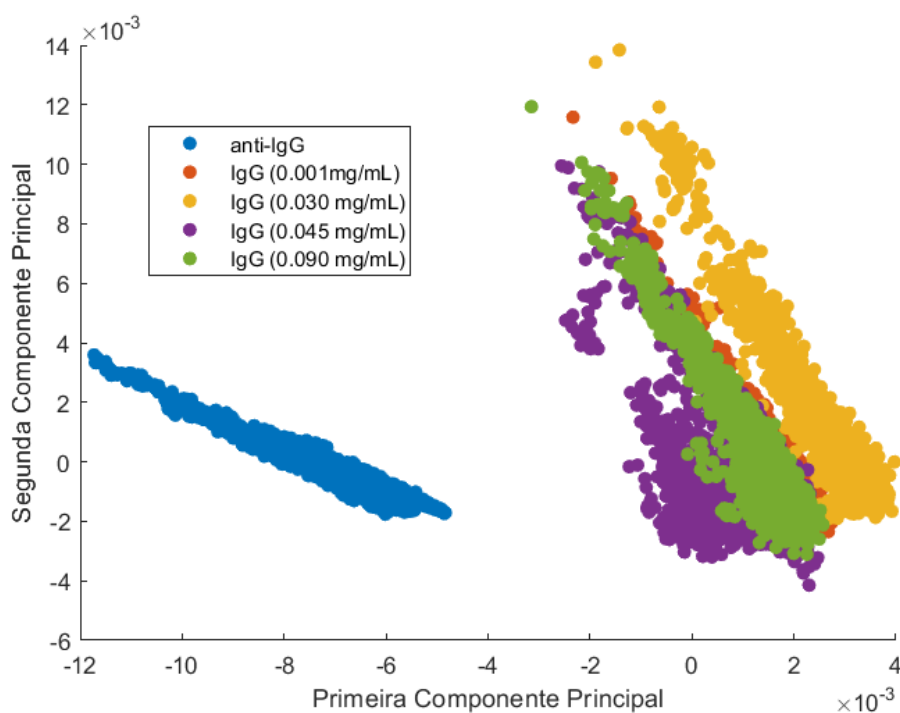
Figura 63 - Comparação dos espectros SERS médios das amostras de (a) anti-IgG, (b – e) IgG (concentração: 1 a 90  $\mu\text{g/mL}$ ).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A partir do gráfico de dispersão dos escores PC1 e PC2 mostrado na Figura 64, é possível concluir que as amostras de antígeno podem ser facilmente discriminadas dos dados do sensor nas concentrações analisadas.

Figura 64 - Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC1 e PC2 dos espectros SERS (n = 2500 espectros) das amostras de anti-IgG e IgG (1 – 90 mg/mL).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os métodos convencionais para a detecção de IgG são baseados no acoplamento antígeno-anticorpo, como, por exemplo, o teste ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunonobert assay*). Esse teste apresenta alta especificidade e seletividade com limite de detecção na ordem de nanomolar. Porém, esse método envolve procedimentos complicados, equipamentos laboratoriais caros, e necessita de uma grande quantidade de amostra (HOSSEINI et al., 2018; MENDES et al., 2022).

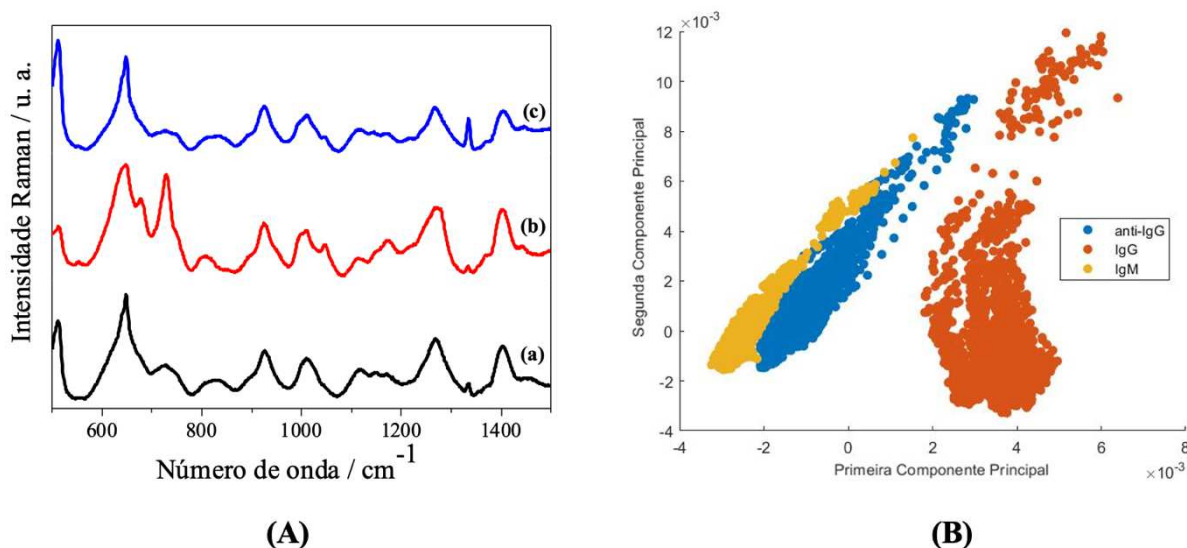
Além disso, os resultados descritos confirmam que o nanocompósito de AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> modificado com anticorpo, pode ser utilizado na detecção direta de antígeno por espectroscopia Raman até 1  $\mu\text{g/mL}$ . Contudo, não foi possível desenvolver um procedimento para fazer uma detecção quantitativa do analito. Assim, acredita-se que com a otimização das etapas de funcionalização, é possível atingir um limite de detecção comparável ao de métodos convencionais e realizar uma análise quantitativa. Mesmo assim, o biossensor desenvolvido pode ser utilizado como uma ferramenta de análise qualitativa.



### 4.12.3 Ensaio de seletividade

A seletividade do biossensor a IgG foi testado utilizando uma solução padrão de IgM como controle negativo. O IgM foi escolhido para a realização desse ensaio devido à sua grande abundância no plasma humano (40 a 230 mg/dL) (KAMIŃSKA et al., 2016). A Figura 65A apresenta os espectros SERS médios do sensor antes e após sua incubação nas soluções de IgM e IgG (concentração = 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Pode-se observar que não há mudanças significativas no perfil espectral, como por exemplo, intensidades relativas e frequências de bandas, quando comparamos os espectros do sensor e depois de sua exposição ao IgM (Figura 65A (a) e (c)). Entretanto, é possível observar mudanças significativas quando comparamos os espectros do sensor e do IgG (Figura 65A (a) e (b)). Além disso, tem-se uma boa discriminação entre as amostras de anti-IgG e IgG (Figura 65B). A sobreposição entre as amostras de anti-IgG e IgM confirmam a pouca variação no perfil espectral para as amostras do sensor antes e depois de sua exposição à amostra de IgM.

Figura 65 - (A) Comparação dos espectros SERS médios das amostras de (a) anti-IgG, (b) IgG e (c) IgM; (B) Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC1 e PC2 dos espectros SERS ( $n = 2500$  espectros) das amostras de anti-IgG, IgG e IgM.

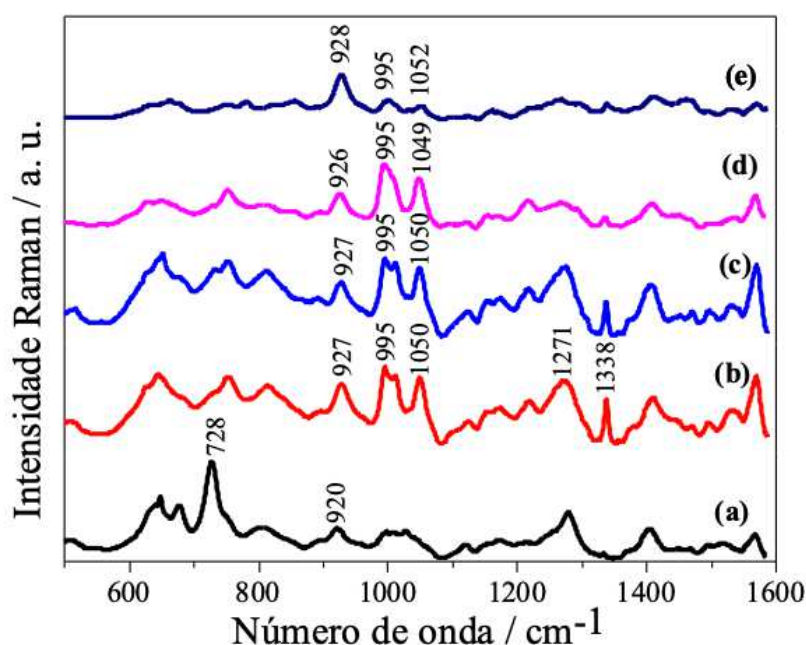


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.12.4 Detecção de ATP utilizando o nanocompósito de AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>

Para demonstrar a capacidade do sensor fabricado na detecção de diferentes analitos, um imunoenensaio para análise direta e label-free de ATP foi desenvolvido. Por meio da funcionalização do substrato com anti-ATP foi possível fazer a detecção do analito em diferentes concentrações (1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ). A Figura 66A traz a comparação dos espectros SERS médios das amostras do sensor antes e após a incubação nas soluções de ATP. É possível observar variações significativas do perfil espectral dos analitos quando comparado ao sensor. Sabe-se que as bandas presentes no espectro SERS da molécula de ATP estão relacionadas aos grupos adenina, ribose e fosfato (LANIR; YU, 1979). Assim, na Figura 66A podemos observar as bandas em 928 e 995  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas ao estiramento do grupo fosfato e a banda em 1049  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupamento O=P=O. Além disso, pode-se notar as bandas na região entre 1200 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  que são em sua maioria relacionadas às vibrações do grupo adenina (NOWAK et al., 2016) (FANG et al., 2015).

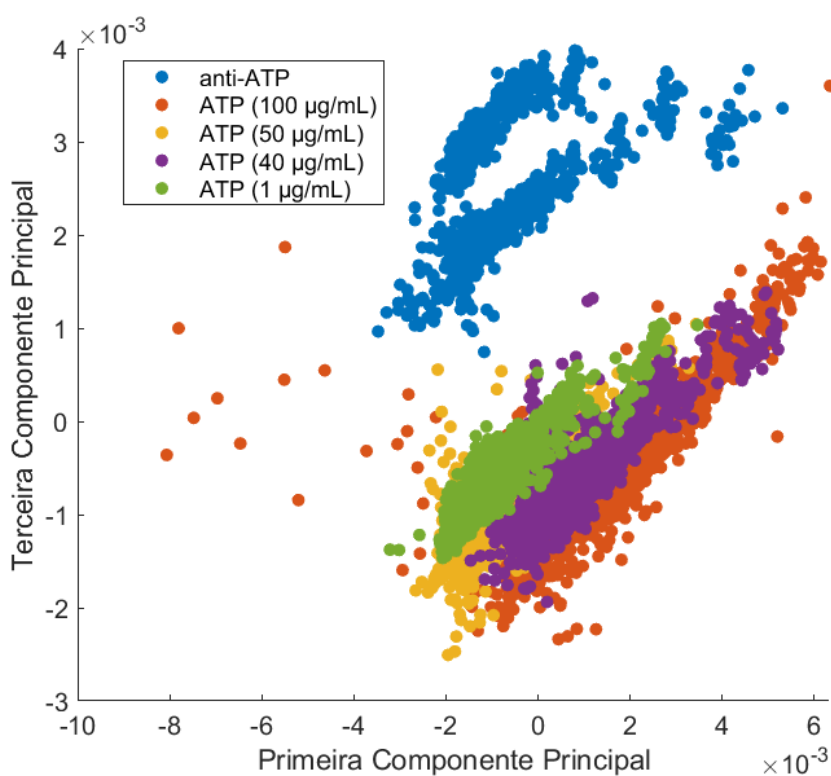
Figura 66 – (A) Comparação dos espectros SERS médios das amostras de (a) anti-ATP, (b) ATP (100  $\mu\text{g/mL}$ ), (c) ATP (50  $\mu\text{g/mL}$ ), (d) ATP (40  $\mu\text{g/mL}$ ) e (e) ATP (1  $\mu\text{g/mL}$ ).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O gráfico de PCA do biossensor antes e após a interação com o ATP em diferentes concentrações (concentração: 1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ) é mostrado na Figura 67. Tem-se que as componentes principais PC1 e PC3 responsáveis por 58,66% da variância total dos dados amostrais (Apêndia A). Observa-se no gráfico de dispersão uma boa separação entre as amostras de anti-ATP e ATP, confirmando a boa sensibilidade do sensor desenvolvido na detecção de diferentes biomoléculas, em concentrações de até 1  $\mu\text{g/mL}$ , empregando-se diferentes metodologias de funcionalização do substrato de AuNP/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub>.

Figura 67 - Gráfico de dispersão entre as componentes principais PC1 e PC3 dos espectros SERS (n = 2500 espectros) das amostras de anti-ATP e ATP.



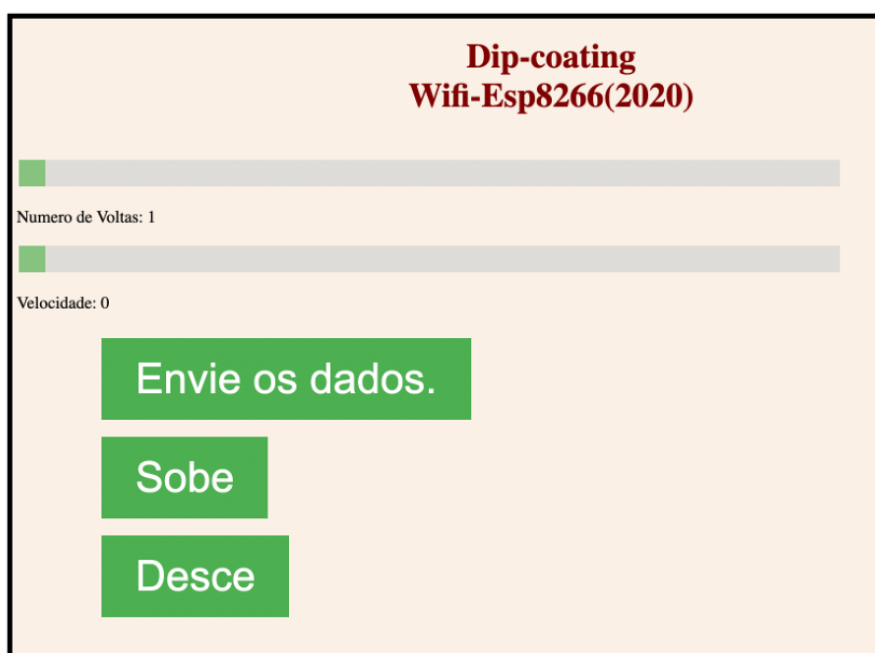
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

## 4.13 CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO DE *DIP-COATING*

### 4.13.1 Operação do equipamento

Para operação do *dip-coating*, primeiramente, é necessário fazer a liberação do Wi-Fi de um dispositivo (celular ou computador) ao acesso à internet a outros dispositivos. Ao ser ligado, o equipamento irá conectar automaticamente na rede e no display será mostrado o endereço de IP: 172.20.10.2. A página HTML que será aberta contém as seguintes informações: número de voltas, velocidade, opções para subir ou descer e enviar os dados (Figura 68). Assim que forem determinados os parâmetros número de voltas e a velocidade, o usuário deve enviar os dados ao equipamento e selecionar se deseja que o equipamento suba ou desça.

Figura 68 - Interface do usuário para operação do equipamento de *dip-coating*.



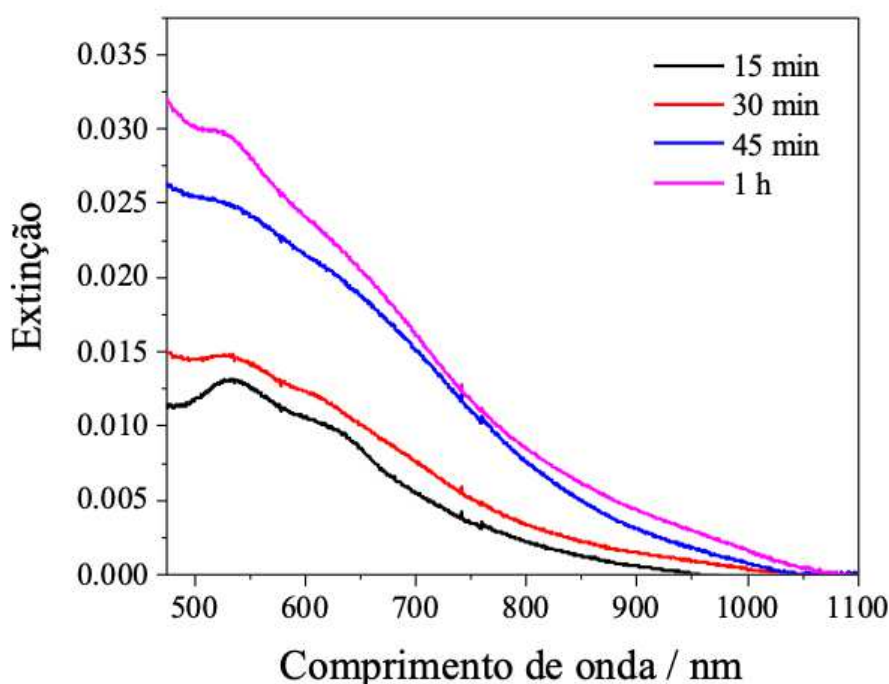
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 4.13.2 Preparação de filmes finos *layer-by-layer* de AuNP e PS-b-P2VP

A fabricação de filmes *layer-by-layer* de AuNP/PS-b-P2VP utilizando o método de *dip-coating* foi acompanhada por meio da espectroscopia UV-VIS. A Figura 69 apresenta os espectros de extinção no UV-VIS para a formação de uma camada composta de PS-b-P2VP e AuNPs. Foram preparados filmes contendo uma camada de PS-b-P2VP, os quais foram imersos

na solução coloidal contendo AuNPs para investigar a influência do tempo na adsorção das nanopartículas. Vários ensaios foram conduzidos, variando o período de imersão em diferentes intervalos de tempo.. Conforme esperado, observa-se um aumento gradual do máximo de absorção com o aumento do tempo de imersão. Isso indica que mais nanopartículas estão sendo adsorvidas no filme à medida que o tempo avança. A partir desse resultado, empregou-se o tempo de 1 h de imersão na solução coloidal para a fabricação dos filmes de bicamadas.

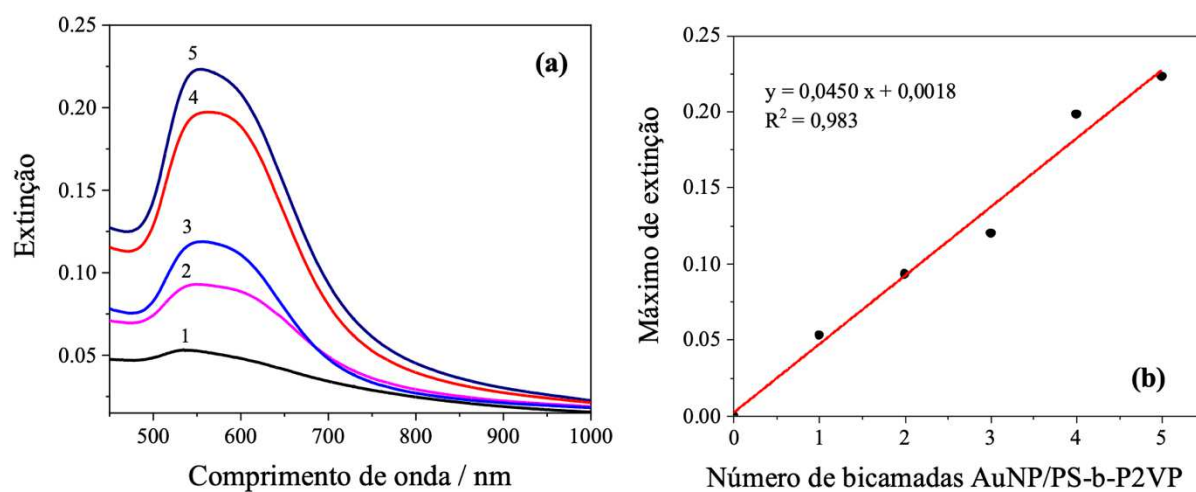
Figura 69 - Espectros UV-VIS dos filmes de PS-b-P2VP com o aumento do tempo de imersão em solução coloidal.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 70a apresenta os espectros UV-VIS de cada deposição de bicamadas para a construção de um filme *layer-by-layer* de AuNP/PS-b-P2VP. Observa-se a presença de uma banda de absorção com máximo em torno de 556 nm, correspondente ao LSPR das nanopartículas de ouro. O aumento linear ( $R^2 = 0,97$ ) do máximo de absorção em relação ao número de bicamadas é mostrado na Figura 70b, indicando que o número de nanopartículas depositadas aumenta com a deposição de múltiplas camadas. Este comportamento linear evidencia que a deposição das AuNPs em cada uma das camadas é reprodutível.

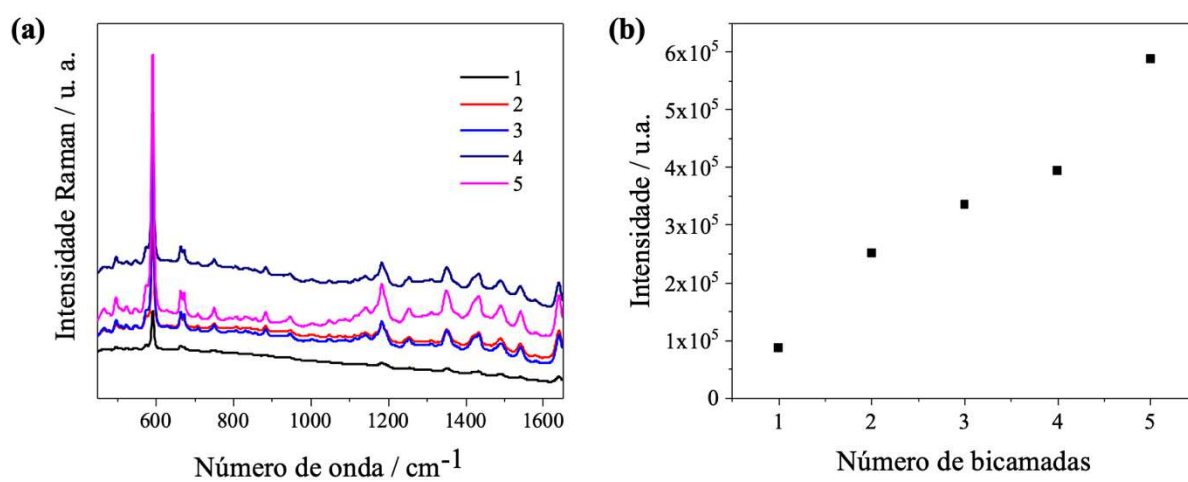
Figura 70 - (a) Espectros UV-VIS dos filmes automontados de AuNP/PS-b-P2VP para cada bicamada depositada; (b) dependência do máximo de extinção com o número de bicamadas.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 71a exibe os espectros Raman SERS médios do corante azul do Nilo ( $1 \times 10^{-4}$  mol L $^{-1}$ ) adsorvido nos filmes automontados. Observa-se que, à medida que o número de bicamadas aumenta, há um aumento na intensidade da banda característica da molécula prova em 591 cm $^{-1}$ . A Figura 71b apresenta um gráfico das intensidades dessa banda, demonstrando o crescimento gradual da intensidade à medida que o número de bicamadas e, consequentemente, o número de nanopartículas adsorvidas aumentam.

Figura 71 - (a) Espectros SERS médios e (b) gráfico comparativo das intensidades da banda em  $591\text{ cm}^{-1}$  das moléculas de azul do Nilo adsorvidas sobre os filmes automontados.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram fabricados filmes finos de AuNP/PS-*b*-P2VP utilizando diferentes procedimentos para a deposição organizada ou controlada das AuNPs. PS-*b*-P2VP com diferentes tamanhos de cadeia de PS e P2VP foram empregados para a produção de filmes via *spin-coating* sobre substratos de vidro. Estes filmes foram imersos em suspensões coloidais de AuNPs para produzir filmes AuNP/PS-*b*-P2VP. Os filmes PS-*b*-P2VP preparados por *spin-coating* foram reticulados empregando o DIB e posteriormente imersos em suspensão coloidal de AuNPs. Os resultados dos filmes de AuNP/PS-*b*-P2VP demonstraram que os filmes utilizando o copolímero PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> apresentaram as AuNPs menos agregadas para todos os tratamentos realizados. Além disso, observou-se que com o aumento da cadeia de P2VP há um aumento da agregação das NPs. Esse resultado pode ser explicado pela formação de microdomínios maiores de P2VP disponíveis para a adsorção das AuNPs. Assim, foi observado que os filmes empregando o copolímero PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> foram os que apresentaram maior sinal SERS. Comparando-se os tratamentos, os tratamentos com vapor de tolueno/THF e tratamento térmico foram os que proporcionaram maior intensidade do sinal SERS, porém o sinal é menos uniforme quando comparado aos mapeamentos dos filmes com os tratamentos por imersão em água deionizada e etanol. Isso se deve ao fato de nos filmes com tratamentos por vapor de tolueno/THF e tratamento térmico temos uma maior quantidade de *hot-spots* formados pela maior agregação das AuNPs.

Na análise dos espectros UV-VIS dos filmes de AuNP/PS<sub>154</sub>-*b*-P2VP<sub>33</sub> reticulados, observou-se o aparecimento de um ombro em maiores comprimentos de onda, indicando a formação das ligações cruzadas entre as cadeias de P2VP. Esse ombro em maiores comprimentos de onda é devido à diminuição nitrogênios disponíveis para a adsorção de AuNPs. Analisando a influência do tamanho da cadeia de P2VP, foi observado que com o aumento da cadeia temos um aumento do número de agregados e conseqüentemente um aumento da intensidade do sinal SERS. Em relação aos tratamentos, foi observado um comportamento semelhante ao observado para os filmes finos de AuNP/PS-*b*-P2VP, ou seja, os tratamentos por vapor de tolueno/THF e tratamento térmico foram os que apresentaram a maior intensidade do sinal SERS. Além disso, os resultados demonstraram que os filmes sintetizados nesse trabalho são uniformes, estáveis e reproduzíveis.

Verificou-se que filmes AuNP/PS<sub>1250</sub>-*b*-P2VP<sub>1285</sub> produzidos por *spin-coating* pode ser empregado como um substrato SERS reutilizável, foram testados os dos corantes azul do Nilo e Rodamina 6G. Estes corantes foram utilizados como moléculas prova e após a obtenção do



espectro SERS, o substrato foi exposto à radiação UV. Observou-se que este sistema atua como fotocatalisador na degradação dos corantes “limpando” o substrato. Foi observado que após cada ciclo de obtenção do SERS e exposição ao UV, o corante é degradado pois o sinal Raman não é mais detectado. Observou-se que, em ambos os casos, o sinal SERS está uniformemente distribuído por toda a área analisada, indicando uma adsorção homogênea do corante. Além disso, mesmo após 4 ciclos de degradação, o substrato permanece estável.

Um biossensor sensível e seletivo baseado em nanopartículas de ouro auto-organizadas em um filme fino de PS-b-P2VP foi fabricado. A análise utilizando espectroscopia UV-VIS confirmou a funcionalização passo a passo por meio do deslocamento consistente para o vermelho do máximo da banda LSPR. As mudanças nas características espectrais dos espectros SERS após cada etapa de funcionalização corroboram os resultados UV-VIS. O biossensor projetado mostrou-se sensível a diferentes concentrações de IgG (1 a 150  $\mu\text{g/mL}$ ), conforme demonstrado nos resultados de SERS e PCA. A seletividade do ensaio foi confirmada por um controle negativo usando IgM. Por fim, um imunoenensaio label-free para ATP, com um limite de detecção de até 1  $\mu\text{g/mL}$ , foi desenvolvido para demonstrar que o nanocompósito AuNPs/PS<sub>1250</sub>-b-P2VP<sub>1285</sub> pode ser adaptado para detectar diferentes tipos de biomoléculas por meio de alterações no processo de funcionalização. Assim, espera-se que o sensor SERS label-free desenvolvido seja uma ferramenta clínica atrativa a ser implementada na detecção de espécies biológicas.

Por último, foi apresentada a construção de um equipamento de *dip-coating* utilizando materiais reaproveitados de sucatas. Utilizando esse equipamento, foram sintetizados filmes *layer-by-layer* automontados de AuNP/PS-b-P2VP. Esses filmes exibiram uniformidade com um aumento linear na intensidade da banda relacionada ao LSPR das AuNPs no espectro UV-VIS a cada bicamada produzida. Os espectros SERS do azul do Nilo nestes filmes apresentaram a banda em 591  $\text{cm}^{-1}$ . Portanto, podemos concluir que o equipamento de *dip-coating* construído mostrou-se eficiente na produção de filmes finos com nanopartículas adsorvidas em matrizes poliméricas.

## PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho se mostram satisfatórios, uma vez que foi possível a síntese de filmes finos reprodutíveis e estáveis com o copolímero PS-*b*-P2VP através das técnicas de *spin-coating* e *dip-coating* e nanopartículas de ouro. Estes filmes podem ser utilizados como substratos SERS e ainda podem ser reutilizados através da remoção da molécula prova pela exposição à radiação UV. Porém, ainda se fazem necessários alguns novos testes, os quais são:

- a) O limite de detecção para os substratos;
- b) Utilização de outras moléculas provas;
- c) Síntese de filmes finos de AgNP em PS-*b*-P2VP;
- d) Emprego dos substratos de AuNP/PS-*b*-P2VP na detecção de biomoléculas em matrizes complexas;
- e) Estudo do mecanismo de degradação dos corantes Azul do Nilo e Rodamina 6G por catálise plasmônica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANEMA, J. R. et al. Surface-enhanced Raman scattering from polystyrene on gold clusters. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, n. 7, p. 745–751, 2010.
- ANZAR, N. et al. A review on Illicit drugs and biosensing advances for its rapid detection. **Process Biochemistry**, v. 113, p. 113-124, 1 fev. 2022.
- ARAUJO, T. P. et al. Understanding plasmonic catalysis with controlled nanomaterials based on catalytic and plasmonic metals. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 39, p. 110-122, 1 fev. 2019.
- AROCA, R. Vibrational spectroscopy (SERS and SERRS). **Journal of Molecular Structure**, v. 292, n. C, p. 17–27, mar. 1993.
- ASLAM, U. et al. **Catalytic conversion of solar to chemical energy on plasmonic metal nanostructures**. **Nature Catalysis**, v.1, p. 656-665, 1 set. 2018.
- AUSTIN SUTHANTHIRARAJ, P. P.; SEN, A. K. Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) biosensor based on thermally annealed silver nanostructures with on-chip blood-plasma separation for detection of dengue non-structural protein NS1 antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 132, n. November 2018, p. 38–46, 2019.
- BATES, F. S.; FREDRICKSON, G. H. Block copolymers-designer soft materials. **Physics Today**, v. 52, n. 2, p. 32–38, 1999.
- BIAN, J. et al. Reproducible and recyclable SERS substrates: Flower-like Ag structures with concave surfaces formed by electrodeposition. **Applied Surface Science**, v. 333, p. 126–133, 1 abr. 2015.
- BROLO, A. G.; ARCTANDER, E.; ADDISON, C. J. Strong polarized enhanced Raman scattering via optical tunneling through random parallel nanostructures in au thin films. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 1, p. 401–405, 2005.
- CHEN, Z. et al. Responsive Micellar Films of Amphiphilic Block Copolymer Micelles: Control on Micelle Opening and Closing. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 8869–8874, 2010.
- CHON, H. et al. On-chip immunoassay using surface-enhanced Raman scattering of hollow gold nanospheres. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 12, p. 5290–5295, 15 jun. 2010.
- CHRISTOPHER, P. et al. Singular characteristics and unique chemical bond activation mechanisms of photocatalytic reactions on plasmonic nanostructures. **Nature Materials**, v. 11, n. 12, p. 1044–1050, dez. 2012.
- CHRISTOPHER, P.; XIN, H.; LINIC, S. Visible-light-enhanced catalytic oxidation reactions on plasmonic silver nanostructures. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 467–472, jun. 2011.
- CLUKAY, C. J. et al. Controlling formation of gold nanoparticles generated in situ at a polymeric surface. **Applied Surface Science**, v. 292, p. 128–136, 2014.

DA SILVA, A. G. M. et al. Plasmonic catalysis with designer nanoparticles. **Chemical Communications**, v. 58, n. 13, p. 2055–2074, 14 fev. 2022.

DARWISH, N. T. et al. Immunofluorescence–based biosensor for the determination of dengue virus NS1 in clinical samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 591–602, 2018.

DEMYDOV, P. V. et al. The approaches for localized surface plasmon resonance wavelength position tuning. Short review. Semiconductor Physics. **Quantum Electronics and Optoelectronics**, v.24, n.3, p. 304-311, 2021.

DENG, T. et al. Two-dimensional block copolymer photonic crystals. **Polymer**, v. 44, n. 21, p. 6549–6553, 2003.

DONG, Y. et al. Plasmonic Catalysis: New Opportunity for Selective Chemical Bond Evolution. **ACS Catalysis**, v.13, p. 6730-6743, 2023.

DOS SANTOS LOPES, D. et al. Regioselective Plasmon-Driven Decarboxylation of Mercaptobenzoic Acids Triggered by Distinct Reactive Oxygen Species. **ACS Catalysis**, v. 12, n. 23, p. 14619–14628, 2 dez. 2022.

FAN, M.; ANDRADE, G. F. S.; BROLO, A. G. A review on recent advances in the applications of surface-enhanced Raman scattering in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1097, p. 1–29, 2020.

FANG, H. et al. Approach for determination of ATP: ADP molar ratio in mixed solution by surface-enhanced Raman scattering. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 69, p. 71–76, 5 jul. 2015.

FARCAU, C.; ASTILEAN, S. Mapping the SERS efficiency and hot-spots localization on gold film over nanospheres substrates. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 27, p. 11717–11722, 2010.

FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163–166, 1974.

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, n. 105, p. 20–22, 1973.

FUNARI, R.; CHU, K. Y.; SHEN, A. Q. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein by gold nanospikes in an opto-microfluidic chip. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 169, n. July, p. 112578, 2020.

GHOSH, S. K. et al. Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold colloids. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 37, p. 13963–13971, 2004.

GHOSH, S. K.; PAL, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. **Chem. Rev.**, v. 107, n. 11, p. 4797–4862, 2007.

GOESMANN, H.; FELDMANN, C. Nanoparticulate functional materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 8, p. 1362–1395, 2010.

GUO, L.; WANG, Z.; WANG, Y. Perpendicular Alignment and Selective Swelling-Induced Generation of Homopores of Polystyrene- b-poly(2-vinylpyridine)- b-poly(ethylene oxide) Triblock Terpolymer. **Macromolecules**, v. 51, n. 16, p. 6248–6256, 2018.

HAES, A. J. et al. Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 7, p. 2264–2271, 2005.

HAMLEY, I. W. **The Physics of Block Copolymers**. Oxford University Press, 1998.

HARIRCHIAN-SAEI, S. et al. Directed polystyrene/poly(methyl methacrylate) phase separation and nanoparticle ordering on transparent chemically patterned substrates. **Langmuir**, v. 28, n. 29, p. 10838–10848, 2012.

HAYWARD, R. C.; CHMELKA, B. F.; KRAMER, E. J. Template cross-linking effects on morphologies of swellable block copolymer and mesostructured silica thin films. **Macromolecules**, v. 38, n. 18, p. 7768–7783, 2005.

HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J.; EROKHIN, P. Kinetics of irreversible adsorption with diffusion: Application to biomolecule immobilization. **Langmuir**, v. 18, n. 5, p. 1770–1776, 5 mar. 2002.

HOSSEINI, S. et al. Advantages, Disadvantages and Modifications of Conventional ELISA. Em: **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z**. p. 67–115.

HUANG, C.-W. et al. A review of biosensor for environmental monitoring: principle, application, and corresponding achievement of sustainable development goals. **Bioengineered**, v. 14, n. 1, p. 58–80, 31 dez. 2023.

IZUMI, C. M. S.; MOFFITT, M. G.; BROLO, A. G. Statistics on surface-enhanced resonance raman scattering from single nanoshells. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 39, p. 19104–19109, 6 out. 2011.

JAIN, P. K.; HUANG, W.; EL-SAYED, M. A. On the universal scaling behavior of the distance decay of plasmon coupling in metal nanoparticle pairs: A plasmon ruler equation. **Nano Letters**, v. 7, n. 7, p. 2080–2088, jul. 2007.

JEBELLI, A. et al. Recent advances in surface plasmon resonance biosensors for microRNAs detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 169, n. August, p. 112599, 2020.

JENCZYK, J. et al. Structural and dynamic study of block copolymer – Nanoparticles nanocomposites. **Polymer**, v. 167, n. January, p. 130–137, 2019.

JEON, T. Y. et al. Nanostructured plasmonic substrates for use as SERS sensors. **Nano Convergence**, v. 3, n. 1, 1 dez. 2016.

JIANG, G. et al. Gold nanorods dispersed in homopolymer films: Optical properties controlled by self-assembly and percolation of nanorods. **ACS Nano**, v. 6, n. 2, p. 1578–1588, 2012.

- JIANG, X. et al. Recyclable Au-TiO<sub>2</sub> nanocomposite SERS-active substrates contributed by synergistic charge-transfer effect. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 18, p. 11212–11219, 2017.
- JUNISU, B. A.; SUN, Y. SEN. Three-Dimensional Interconnected Network of Gold Nanostructures for Molecular Sensing via Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy. **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 8, p. 7950–7962, 2020.
- KAMIŃSKA, A. et al. ABO blood groups' antigen-antibody interactions studied using SERS spectroscopy: Towards blood typing. **Analytical Methods**, v. 8, n. 7, p. 1463–1472, 21 fev. 2016.
- KARAYIANNI, M.; PISPAS, S. Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers in Selective Solvents. Em: 16. ed. Switzerland: Springer, p. 27–64.
- KIM, J. K. et al. Functional nanomaterials based on block copolymer self-assembly. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 35, n. 11, p. 1325–1349, 2010.
- KRAMPA, F. D. et al. Recent advances in the development of biosensors for malaria diagnosis. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 3, 2020.
- KUPERKAR, K. et al. Amphiphilic Block Copolymers: Their Structures, and Self-Assembly to Polymeric Micelles and Polymersomes as Drug Delivery Vehicles. **Polymers**, v. 14, n. 21, 1 nov. 2022.
- LANIR, A.; YU, N. T. A Raman spectroscopic study of the interaction of divalent metal ions with adenine moiety of adenosine 5'-triphosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 13, p. 5882–5887, 10 jul. 1979.
- LAZZARI, M.; TORNEIRO, M. A global view on block copolymers. **Polymers**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2020.
- LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy**. 2009
- LI, J. et al. Label-Free SERS Analysis of Serum Using Ag NPs/Cellulose Nanocrystal/Graphene Oxide Nanocomposite Film Substrate in Screening Colon Cancer. **Nanomaterials**, v. 13, n. 2, 1 jan. 2023.
- LI, M.; CUSHING, S. K.; WU, N. Plasmon-enhanced optical sensors: A review. **Analyst**, v. 140, n. 2, p. 386–406, 2015.
- LIN, H. et al. Gold nanoparticle substrates for recyclable surface-enhanced Raman detection of Rhodamine 6G and Sudan I. **Thin Solid Films**, v. 526, p. 133–138, 30 dez. 2012.
- LIU, Y. Q. et al. A self-cleaning SERS substrate based on flower-like Au@MoS<sub>2</sub>/Ag NPs with photocatalytic ability. **Vibrational Spectroscopy**, v. 126, 1 maio 2023.
- LIU, Z. et al. Gold nanoparticle arrays assembled on the reconstructed surface of block copolymer thin films. **RSC Advances**, v. 3, n. 43, p. 20464–20470, 2013.

- LIU, Z. et al. Cross-linked block copolymer templated assembly of nanoparticle arrays with high density and position selectivity. **Applied Surface Science**, v. 384, p. 400–405, 2016.
- LODGE, T. P. Block Copolymers: Past Successes and Future Challenges. n. i, p. 265–273, 2003.
- LOPES, D. S. et al. Inhibition of p-Nitrothiophenol Catalytic Hydrogenation on Ag-Containing AgAu/Pd/TiO<sub>2</sub> Plasmonic Catalysts Probed in situ by SERS. **ChemCatChem**, v. 14, n. 5, 8 mar. 2022.
- LUO, Y. L. et al. Assembly, characterization and swelling kinetics of Ag nanoparticles in PDMAA-g-PVA hydrogel networks. **Materials Chemistry and Physics**, v. 118, n. 2–3, p. 329–336, 2009.
- LY, T. N.; PARK, S. High Performance Detection of Alzheimer's Disease Biomarkers Based on Localized Surface Plasmon Resonance. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 91, p. 182–190, 2020.
- MAIER, S. A. **Plasmonics: fundamentals and applications**. Springer, 2007.
- MALACHOSKY, E. W.; FILATOV, A.; GUYOT-SIONNEST, P. Enhanced Corrugation and Chemical Contrast of Diblock Copolymer Films by Sequential Solvent Exposures. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 40, p. 23117–23122, 2018.
- MARQUES, F. C. et al. Characterization of 11-mercaptopundecanoic and 3-mercaptopropionic acids adsorbed on silver by surface-enhanced Raman scattering. **Vibrational Spectroscopy**, v. 98, p. 139–144, 1 set. 2018.
- MATYIAZEWSKI, K.; MÖLLER, M. **Polymer Science: a Comprehensive**. v. 7, 2013.
- MAURIZ, E. Recent progress in plasmonic biosensing schemes for virus detection. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 17, p. 1–27, 2020.
- MCNAMARA, K.; TOFAIL, S. A. M. Nanoparticles in biomedical applications. **Advances in Physics: X**, v. 2, n.1, p. 54-88, 2017.
- MENDES, J. P. et al. Differential Refractometric Biosensor for Reliable Human IgG Detection: Proof of Concept. **Biosensors**, v. 12, n. 7, 1 jul. 2022.
- MISHRA, A.; BHATT, N.; BAJPAI, A. K. Nanostructured superhydrophobic coatings for solar panel applications. Em: **Nanomaterials-Based Coatings: Fundamentals and Applications**. Elsevier, 2019. p. 397–42.
- MOSKOVITS, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: A brief retrospective. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 6–7, p. 485–496, 2005.
- NATH, N.; CHILKOTI, A. A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 504–509, 1 fev. 2002.

- NATH, N.; CHILKOTI, A. Label-free biosensing by surface plasmon resonance of nanoparticles on glass: Optimization of nanoparticle size. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 18, p. 5370–5378, 2004.
- NORO, A. et al. Enthalpy-Driven Swelling of Photonic Block Polymer Films. **Macromolecules**, v. 49, n. 23, p. 8971–8979, 2016.
- NOWAK, M. et al. Preparation of silver material used for detection of biocomplexes by surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Applied Physics**, v. 120, n. 5, 7 ago. 2016.
- OGAWA, H. et al. Direct Observation on Spin-Coating Process of PS-b-P2VP Thin Films. **Macromolecules**, v. 49, n. 9, p. 3471–3477, 2016.
- ORTIZ-DOSAL, A. et al. Determination of the Immunoglobulin G Spectrum by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Quasispherical Gold Nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2021, 2021.
- PATRO, S. et al. ATP synthase and mitochondrial bioenergetics dysfunction in alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, n. 20, 1 out. 2021.
- PILOT, R. et al. A review on surface-enhanced Raman scattering. **Biosensors**, v. 9, n. 2, 1 jun. 2019.
- PEIXOTO, L. P. F.; SANTOS, J. F. L.; ANDRADE, G. F. S. Plasmonic nanobiosensor based on Au nanorods with improved sensitivity: A comparative study for two different configurations. **Analytica Chimica Acta**, v. 1084, p. 71–77, 25 nov. 2019.
- PORTER, M. D. et al. SERS as a bioassay platform: Fundamentals, design, and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 5, p. 1001–1011, 29 abr. 2008.
- PRAKASH, J. Fundamentals and applications of recyclable SERS substrates. **International Reviews in Physical Chemistry**, 3 abr. 2019.
- QU, Q. et al. AuNP array coated substrate for sensitive and homogeneous SERS-immunoassay detection of human immunoglobulin G. **RSC Advances**, v. 11, n. 37, p. 22744–22750, 28 jun. 2021.
- PUETZ, J.; AEGERTER, M. A. 2.2.1 DIP COATING TECHNIQUE.
- RECHBERGER, W. et al. Optical properties of two interacting gold nanoparticles. **Optics Communications**, v. 220, n. 1–3, p. 137–141, 1 maio 2003.
- REKHA, C. R.; NAYAR, V. U.; GOPCHANDRAN, K. G. Synthesis of highly stable silver nanorods and their application as SERS substrates. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 3, n. 2, p. 196–205, 2018.
- ROLAND, S. et al. Morphology evolution in slowly dip-coated supramolecular PS-b-P4VP thin films. **Macromolecules**, v. 45, n. 13, p. 5463–5476, 2012.
- SAVIÑÓN-FLORES, F. et al. A review on sers-based detection of human virus infections: Influenza and coronavirus. **Biosensors**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2021.



- SHAFI, M. et al. Highly sensitive and recyclable surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrates based on photocatalytic activity of ZnSe nanowires. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 356, 1 abr. 2022.
- SHANMUKH, S. et al. Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate. **Nano Letters**, v. 6, n. 11, p. 2630–2636, nov. 2006.
- SHI, A. C. Frustration in block copolymer assemblies. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 33, n. 25, p. 253001, 2021.
- SHIOHARA, A.; WANG, Y.; LIZ-MARZÁN, L. M. Recent approaches toward creation of hot spots for SERS detection. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 21, p.2-25, 1 dez. 2014.
- SHU, X. et al. Selective hydroformylation of alkyl acrylates using [2,2'-bis(dipyrrolylphosphinoxy)-1,1'-(±)-binaphthyl]/Rh catalyst: reversal of regioselectivity. **RSC Adv.**, v. 7, n. 24, p. 14816–14823, 2017.
- SIKARWAR, B. et al. Surface plasmon resonance characterization of monoclonal and polyclonal antibodies of malaria for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 60, p. 201–209, 2014.
- SINHA, G.; DEPERO, L. E.; ALESSANDRI, I. Recyclable SERS substrates based on Au-Coated ZnO nanorods. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 3, n. 7, p. 2557–2563, 27 jul. 2011.
- STETSENKO, M. O. et al. Optical Properties of Gold Nanoparticle Assemblies on a Glass Surface. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, 2017.
- STEWART, M. E. et al. Nanostructured plasmonic sensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 494–521, 2008.
- STILES, P. L. et al. **Surface-enhanced Raman spectroscopy. Annual Review of Analytical Chemistry**, 2008.
- STORHOFF, J. J. et al. One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 120, p. 1959-1964, 1988.
- TAYLOR, J. F. Spin coating: An overview. **Metal Finishing**, v. 99, n. 1, p. 16–21, 2001.
- TRIPP, R. A.; DLUHY, R. A.; ZHAO, Y. **Novel nanostructures for SERS biosensing. Nano Today**, jun. 2008.
- TSAI, W. H. et al. Characterization of Adsorbed 2-Vinylpyridine/Styrene Diblock Copolymers on Silver Surfaces Using Surface-Enhanced Raman Scattering. **Macromolecules**, v. 24, n. 9, p. 2538–2545, 1991.
- USMAN, F. et al. Biosensing through surface enhanced Raman spectroscopy: A review on the role of plasmonic nanoparticle-polymer composites. **European Polymer Journal**, v. 195, p. 112250, ago. 2023.

VADLAMANI, B. S. et al. Functionalized tio<sub>2</sub> nanotube-based electrochemical biosensor for rapid detection of sars-cov-2. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 20, p. 1–10, 2020.

WANG, Y.; LI, F. An emerging pore-making strategy: Confined swelling-induced pore generation in block copolymer materials. **Advanced Materials**, v. 23, n. 19, p. 2134–2148, 2011.

WANG, Y.; ZHOU, W. A Review on Inorganic Nanostructure Self-Assembly. v. 10, n. 3, p. 1563–1583, 2010.

WILEY, B. J. et al. Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 32, p. 15666–15675, 17 ago. 2006.

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

WU, Y. et al. High-adhesive superhydrophobic 3D nanostructured silver films applied as sensitive, long-lived, reproducible and recyclable SERS substrates. **Nanoscale**, v. 6, n. 16, p. 9720–9726, 21 ago. 2014.

XIE, Z. et al. TiO<sub>2</sub> nanorod arrays decorated with Au nanoparticles as sensitive and recyclable SERS substrates. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 861, 25 abr. 2021.

YAMAMOTO, Y. S.; ITOH, T. Why and how do the shapes of surface-enhanced Raman scattering spectra change? Recent progress from mechanistic studies. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 47, n. 1, p. 78–88, 2016.

YILBAS, B. S.; AL-SHARAFI, A.; ALI, H. Surfaces for Self-Cleaning. Em: **Self-Cleaning of Surfaces and Water Droplet Mobility**. Elsevier, 2019. p. 45–98.

ZHAO, J. et al. Plasmonic heterogeneous catalysis for organic transformations. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 52, 1 set. 2022.

ZHOU, J.; ZHANG, C.; WANG, Y. Nanoporous block copolymer membranes immobilized with gold nanoparticles for continuous flow catalysis. **Polymer Chemistry**, v. 10, n. 13, p. 1642–1649, 2019.

ZHU, C. et al. Ag nanosheet-assembled micro-hemispheres as effective SERS substrates. **Chemical Communications**, v. 47, n. 9, p. 2709–2711, 14 fev. 2011.

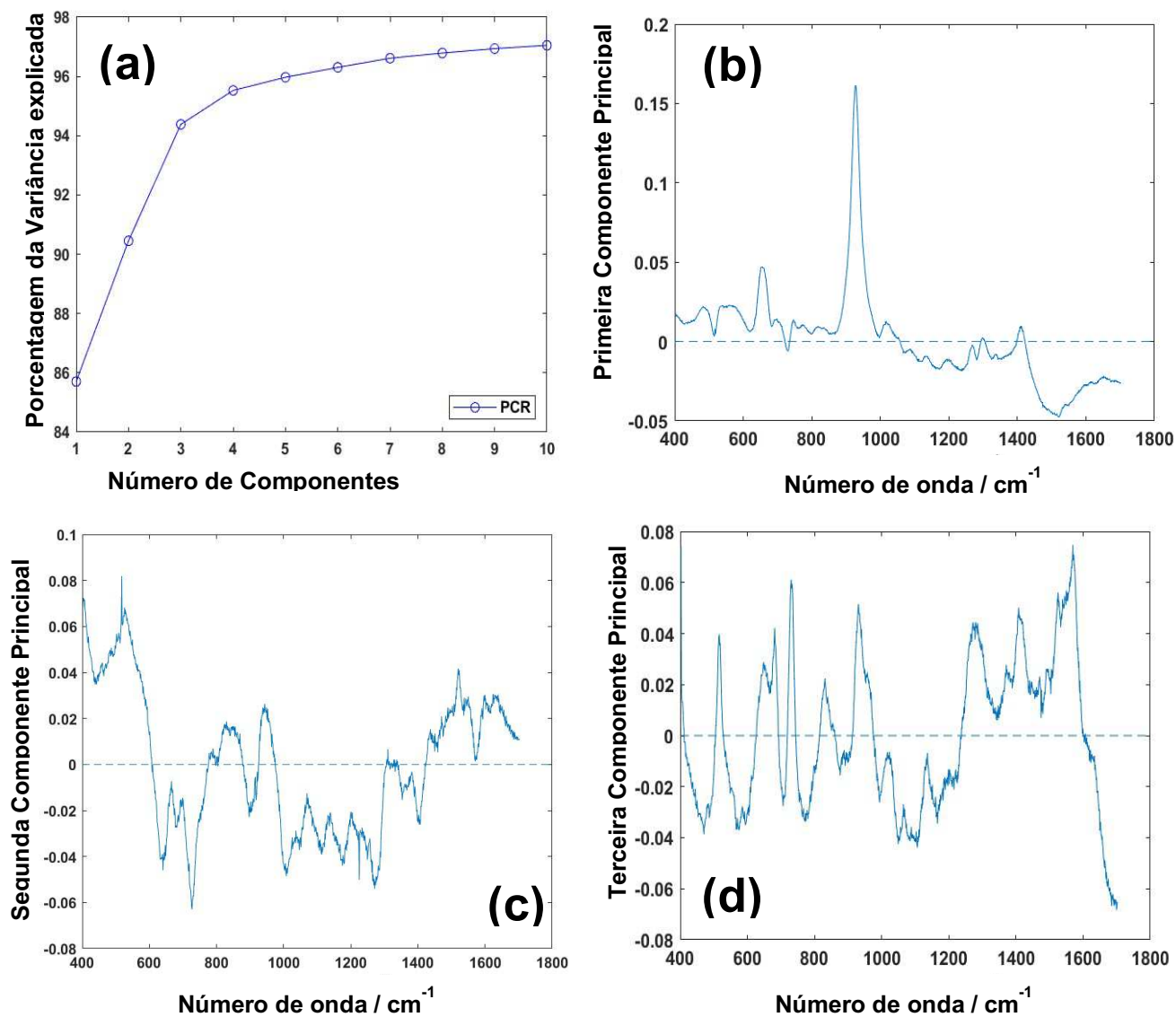
ZHU, D.; ZHOU, Q. Action and mechanism of semiconductor photocatalysis on degradation of organic pollutants in water treatment: A review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 12, 1 dez. 2019.

ZHU, H.; MASSON, J. F.; BAZUIN, C. G. Monolayer Arrays of Nanoparticles on Block Copolymer Brush Films. **Langmuir**, v. 35, n. 15, p. 5114–5124, 2019.

ZHU, H.; MASSON, J. F.; BAZUIN, C. G. Templating Gold Nanoparticles on Nanofibers Coated with a Block Copolymer Brush for Nanosensor Applications. **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 1, p. 516–529, 2020.

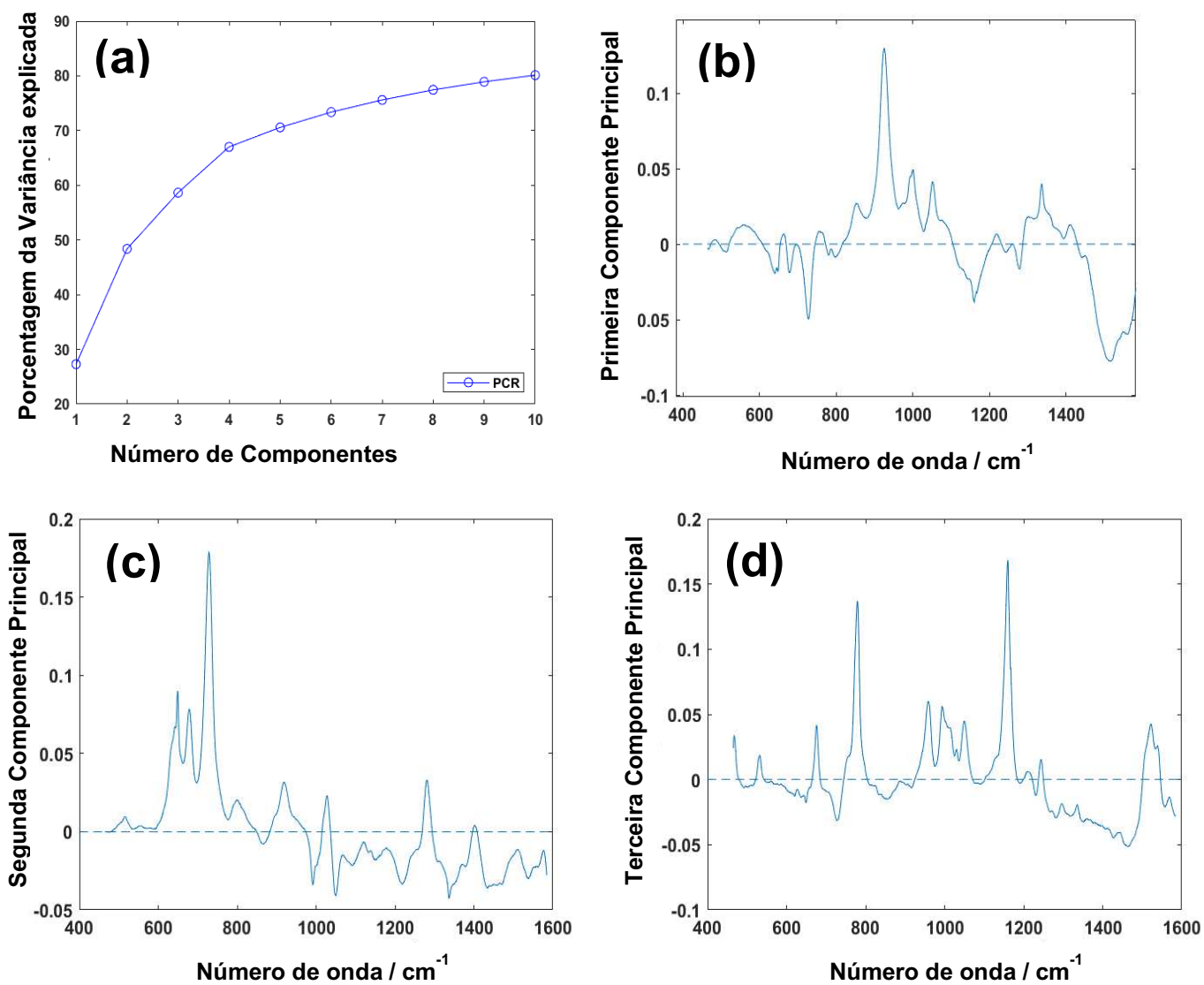
## ANEXO A – Funcionalização e detecção de IgG por SERS

Figura 72 - PCA da funcionalização e detecção de IgG: (a) Variância, (b) Primeira Componente Principal, (c) Segunda Componente Principal, (d) Terceira Componente Principal.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 73 - PCA da detecção direta de ATP: (a) Variância, (b) Primeira Componente Principal, (c) Segunda Componente Principal, (d) Terceira Componente Principal.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

**ANEXO B - Código fonte**

```
#include "index1.h"
#include <ESP8266WiFi.h>
#include <WiFiClient.h>
#include <ESP8266WiFiMulti.h>
#include <ESP8266mDNS.h>
#include <ESP8266WebServer.h>
#include <Wire.h>
#include <LiquidCrystal_I2C.h>

LiquidCrystal_I2C lcd(0x27, 16, 2);

const int ENA = 16;
const int DIR = 14;
const int STP = 12;
const int MS1 = 13;
const int MS2 = 2;
const int MS3 = 0;

long numTurns = 1;
int velocity = 100;
long stepsPerRevolution = 3200 * numTurns;

ESP8266WiFiMulti wifiMulti;
ESP8266WebServer server(80);

void setup() {
  pinMode(STP, OUTPUT);
  pinMode(DIR, OUTPUT);
  pinMode(ENA, OUTPUT);
  pinMode(MS1, OUTPUT);
  pinMode(MS2, OUTPUT);
  pinMode(MS3, OUTPUT);

  digitalWrite(ENA, HIGH);
  digitalWrite(MS1, HIGH);
  digitalWrite(MS2, HIGH);
  digitalWrite(MS3, HIGH);

  lcd.init();
  lcd.backlight();
  lcd.print("Dip-coating");
  lcd.setCursor(0, 1);
  lcd.print("MOYRA 2020");

  Serial.begin(115200);
  delay(10);
  Serial.println();
```

```

wifiMulti.addAP("RedmiRadias", "12345677");
wifiMulti.addAP("iPhoneMoyra", "octaviofv16");
wifiMulti.addAP("ssid_from_AP_3", "your_password_for_AP_3");

Serial.println("Connecting ...");
while (wifiMulti.run() != WL_CONNECTED) {
  delay(250);
  Serial.print('.');
}
Serial.println();
Serial.print("Connected to ");
Serial.println(WiFi.SSID());
Serial.print("IP address:\t");
Serial.println(WiFi.localIP());

lcd.clear();
lcd.print("esp8266.local");
lcd.setCursor(0, 1);
lcd.print(WiFi.localIP());

if (MDNS.begin("esp8266")) {
  Serial.println("mDNS responder started");
} else {
  Serial.println("Error setting up MDNS responder!");
}

server.on("/", []() {
  server.send(200, "text/html", FPSTR(MAIN_page));
});

server.on("/defvars", []() {
  numTurns = server.arg("nvol").toInt();
  velocity = map(server.arg("vel").toInt(), 0, 100, 3200, 100);
  stepsPerRevolution = 3200 * numTurns;
  server.send(200, "text/html", FPSTR(MAIN_page));
});

server.on("/left", []() {
  server.send(200, "text/html", FPSTR(MAIN_page));
  digitalWrite(ENA, LOW);
  digitalWrite(DIR, HIGH);
  for (long x = 0; x < stepsPerRevolution; x++) {
    digitalWrite(STP, HIGH);
    delayMicroseconds(velocity);
    digitalWrite(STP, LOW);
    delayMicroseconds(velocity);
    yield();
  }
  digitalWrite(ENA, HIGH);
}

```

```
});  
  
server.on("/right", []() {  
  server.send(200, "text/html", FPSTR(MAIN_page));  
  digitalWrite(ENA, LOW);  
  digitalWrite(DIR, LOW);  
  for (long x = 0; x < stepsPerRevolution; x
```

### ANEXO C – Artigos publicados

Durante o período de desenvolvimento da pesquisa os seguintes artigos foram publicados, não tendo necessariamente relação com o tema da tese:

MOYRA VIEIRA, F.; GABRIELA CALISTO, C. M.; IZUMI, C. Construction of SERS substrates by gold nanoparticles assembly on polymeric matrices. **Applied Surface Science**, v. 612, p. 155818, mar. 2023.

VIEIRA, M. F. et al. A Direct Immunoassay Based on Surface-Enhanced Spectroscopy Using AuNP/PS-b-P2VP Nanocomposites. **Sensors**, v. 23, n. 10, 1 maio 2023.

DA SILVA, B. N.; VIEIRA, M. F.; IZUMI, C. M. S. In situ preparation of silver nanoparticles on polyaniline nanofibers for SERS applications. **Synthetic Metals**, v. 291, n. August, p. 117171, 2022.