

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Dissertação de Mestrado

DESENVOLVIMENTO DE NANOMATERIAIS E NANOCOMPÓSITOS PARA APLICAÇÃO EM  
DETECÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA POR ESPALHAMENTO DE LUZ.

ANDERSON CAIRES DE JESUS

Autor: Anderson Caires de Jesus

Orientador: Luiz Orlando Ladeira

Janeiro/2016

# UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Anderson Caires de Jesus

## DESENVOLVIMENTO DE NANOMATERIAIS E NANOCOMPÓSITOS PARA APLICAÇÃO EM DETECÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA POR ESPALHAMENTO DE LUZ

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da escola de engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Luiz Orlando Ladeira

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Engenharia

2016

# DEDICATÓRIA

*Ao meu pai que sempre  
esteve do meu lado.*

# AGRADECIMENTOS

# SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>5</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 - Motivação, problema abordado e estrutura da dissertação.</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 - Plasmônica</b> .....	<b>19</b>
1.2.1 - Propriedades ópticas dos metais – Modelo de Drude. ....	22
1.2.1.1 - Ressonância de plasmon em pequenas partículas esféricas. ....	24
1.2.1.2 - Ressonância de plasmon em pequenas partículas não esféricas. ....	26
<b>1.3 - Espectroscopia Raman</b> .....	<b>29</b>
<b>1.4 - SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy)</b> .....	<b>31</b>
<b>1.5 - Dynamic light scattering (DLS)</b> .....	<b>33</b>
<b>1.6 - Nanomateriais</b> .....	<b>37</b>
1.6.1 - Nanomateriais de carbono .....	37
1.6.2 - Óxido de grafeno (GO) .....	39
1.6.3 - Óxido de grafeno reduzido (rGO) .....	40
1.6.4 - Nanobastões de Ouro .....	41
1.6.5 - Propriedades plasmônicas de Nanobastões de Ouro .....	43
1.6.6 - Nanobastões em SERS .....	45
1.6.7 - Nanocompósitos .....	46
<b>2 - OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1 - Objetivos específicos</b> .....	<b>49</b>
<b>3 - PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1 - Materiais</b> .....	<b>52</b>
<b>3.2 - Técnicas de caracterização</b> .....	<b>53</b>
<b>3.3 - Síntese de nanobastões de ouro</b> .....	<b>54</b>
3.3.1 - Síntese de nanobastões de ouro – Método mediado por semente .....	54
3.3.1.1 - Solução semente .....	55
3.3.1.2 - Solução de crescimento .....	55
3.3.1.3 - Purificação .....	56
3.3.1.4 - Caracterização .....	57
3.3.6 - Síntese de nanobastões de ouro – Método de irradiação por luz UV .....	61
3.3.7 - Síntese de nanobastões de ouro – Método mediado por semente por adição de compostos aromáticos. ....	64
<b>3.4 - Síntese de nanocompósitos entre óxido de grafeno e Nanobastões de Ouro ....</b>	<b>67</b>
3.4.1 - Síntese do óxido de grafeno (GO) .....	67
3.4.2 - Caracterização do óxido de grafeno .....	68
3.4.3 - Síntese de nanocompósitos entre óxido de grafeno e Nanobastões de ouro .....	70

<b>3.5 - Síntese de nanocompósitos entre Nanotubos de Carbono e nanobastões de ouro .....</b>	<b>78</b>
3.5.1 - Funcionalização dos Nanotubos de carbono .....	78
3.5.2 - Caracterização dos Nanotubos de carbono .....	78
3.5.3 - Síntese de nanocompósitos entre Nanotubos de carbono e Nanobastões de ouro. ....	81
<b>3.6 - Experimentos SERS .....</b>	<b>87</b>
3.6.1 - Moléculas modelo para experimentos SERS .....	87
3.6.2 - Procedimentos Experimentais .....	90
3.6.3 - Medidas SERS em nanobastões de ouro puros .....	90
3.6.4 - Medidas SERS no filme de óxido de grafeno e nanobastões de ouro .....	94
3.6.5 - Janela de Ressonância .....	100
3.6.6 - Medidas de SERS Químico. ....	101
3.6.7 - Medidas SERS nos nanocompósitos de Nanotubos e Carbono e Nanobastões de ouro.....	102
<b>3.7 - Espalhamento dinâmico de luz aplicado à biodeteccção .....</b>	<b>112</b>
<b>4 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>120</b>
<b>5 - BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>122</b>
<b>6 - ANEXOS.....</b>	<b>132</b>

# LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Aplicações de nanosensores (Fonte: Criada através de imagens de domínio público).....	17
Figura 2 - Ilustrações mostrando os dois tipos de ressonância de plasmon, em a) <i>surface plasmon polariton</i> , plasmons que se propagam na interface entre um dielétrico e um metal e em (b) o <i>localized surface plasmon</i> , ressonância de plasmon de superfície localizada, oscilação coletiva dos elétrons em nanopartículas metálicas. (Modificado e reproduzido com permissão de referência (22) (Willets and Van Duyne, 2007)).	21
Figura 3 - Dependência espectral das partes real e imaginária da função permissividade (Fonte: <a href="http://web.missouri.edu/~speckan/witch-stuff/Research/chapter4/node7.html">http://web.missouri.edu/~speckan/witch-stuff/Research/chapter4/node7.html</a> )	24
Figura 4 - Efeito da morfologia das nanopartículas em seu espectro de absorção óptica. (Modificado e reproduzido com permissão da referência (28)).....	28
Figura 5 - Explicação do efeito Raman em níveis de energia. Adaptado da referência (32).	29
Figura 6 - Espalhamento de luz em nanopartículas de diferentes diâmetros (Fonte: Referência (55)).....	35
Figura 7 - Diferentes tipos de nanomateriais de carbono [reproduzido com permissão de Nature Materials] (2).	37
Figura 8 - Processo de formação do óxido de grafeno reduzido.....	40
Figura 9 - Nanoestruturas de ouro de diversas morfologias. Pequenas Nanoesferas (a) Grandes Nanopartículas com superfície rugosa (b), Nanobastões (c) (d), Nanoshells (e), Nanogaiolas (f), Nanopartículas ocas (g), Tetraedros/octoedros/cubos/icosahedros (h), formato randômico (i), Pirâmides (j), Nanogaiolas Cubicas (k), nanobastões espessos (l), Cubos (m), diversas faces piramidais (n) (o), nano triângulos (p). (Modificado e reproduzido com permissão da referência (4)).....	42
Figura 10 – (a) Propriedades dos nanobastões de ouro, quando excitados por uma radiação ressonante três processos de decaimento acontecem nos nanobastões de ouro, geração de pares elétron-buraco, termonização, e emissão de fótons. Além disto, parte da luz também é espalhada. (b) Forte campo elétrico criado em torno dos nanobastões na condição de ressonância, (c) Troca de carga nos nanobastões de ouro. (Modificado e reproduzindo com permissão das referências (77) (4))	44

Figura 11 - Síntese de nanobastões de ouro – Método mediado por semente. Processo de síntese (Modificado e reproduzido com permissão da referência (99)).....	55
Figura 12 – fotografias mostrando diferentes soluções coloidais de nanobastões de ouro...	56
Figura 13 - a) Nanobastões de ouro antes da purificação b) impurezas removidas c) nanobastões após a purificação. ....	56
Figura 14 - Espectros de absorção óptica de nanobastões de ouro sintetizados pelo método mediado por semente com diferentes razões de aspecto. ....	57
Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanobastões de ouro, a-d) Imagens de vários pontos da mesma amostra de nanobastões, mostrando a homogeneidade da síntese por semente, e) Imagem de campo escuro de nanobastões de ouro, f) Imagem de alta resolução. ....	58
Figura 16 - imagens de microscopia eletrônica de transmissão de um grupo de nanobastões e sua imagem de difração de elétrons e de um nanobastão isolado e sua imagem de difração de elétrons.....	59
Figura 17 - Imagem de AFM de um nanobastão de ouro. ....	60
Figura 18 - Imagem de AFM de um grupo de nanobastões de ouro. ....	60
Figura 19 - Processo de síntese de nanobastões de ouro por irradiação de luz ultravioleta.	62
Figura 20 - Espectro UV-Vis-NIR de nanobastões sintetizados por irradiação UV. ....	62
Figura 21 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanobastões de ouro sintetizados pelo método de irradiação por UV.....	63
Figura 22 - Espectro UV-Vis-NIR de nanobastões sintetizados pelo método de semente com adição de compostos aromáticos .....	65
Figura 23 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanobastões de ouro sintetizados pelo método de sementes com adição de compostos aromáticos.....	66
Figura 24 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de folhas de óxido de grafeno. ....	68
Figura 25 - a) Absorção óptica de solução de óxido de grafeno, b) espectro Raman do óxido de grafeno.....	69
Figura 26 - Imagens de microscopia de força atômica de folhas de GO. ....	69
Figura 27 - Ilustração do processo de formação de híbridos entre óxido de grafeno (GO) e nanobastões de ouro. ....	71
Figura 28 - (a-d) imagens de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando que os nanobastões de ouro estão suportados por folhas de óxido de grafeno em diferentes aumentos, em e) análise estatística, e em f) ilustração do híbrido formado.....	72

Figura 29 - Espectros de Absorção óptica UV-VIS-NIR, dos nanobastões sintetizados separadamente (Azul), do híbrido com óxido de grafeno (Preto), e do óxido de grafeno puro (vermelho).....	74
Figura 30 - Caracterização do filme formado pelo nanocompósito entre GO e nanobastões de ouro. a) fotografia do filme, b) imagem de microscopia ótica, c, d e e) imagens de microscopia eletrônica de varredura em diferentes aumentos. ....	76
Figura 31 - Espectro de absorção óptica do filme formado apenas com GO (Vermelho) e pelo nanocompósito entre óxido de grafeno e os nanobastões de ouro (preto). ....	77
Figura 32 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanotubos dos carbono. ....	79
Figura 33 – Termogravimetria dos nanotubos de carbono.....	80
Figura 34 - Ilustração do processo de formação de híbridos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro. ....	82
Figura 35 - (a-d) imagens de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando que os nanobastões de ouro estão suportados por nanotubos de carbono em diferentes aumentos, em e) imagens de microscopia eletrônica de varredura. ....	83
Figura 36 - Espectros de Absorção óptica UV-VIS-NIR, dos nanobastões sintetizados separadamente (preto), e do nanocompósito com nanotubos de carbono (vermelho). ....	84
Figura 37 - Formulas químicas dos corantes utilizados como moléculas modelo para medidas de SERS.....	87
Figura 38 - Espectro de absorção óptica dos corantes utilizados. ....	87
Figura 39 - Espectro Raman do cresyl violeta obtido da referência (106). ....	88
Figura 40 - Espectro Raman do azul de metileno obtido da referência (108). ....	89
Figura 41 - Espectro Raman da Rodamina R6G. ....	89
Figura 42 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de nanobastões de ouro sobre silício.....	92
Figura 43- Espectro SERS do CV em nanobastões de ouro puros, em preto espectro Raman medido em vidro sem condição de SERS e, em vermelho o espectro medido sob o substrato mostrado grande amplificação do sinal Raman. ....	93
Figura 44 -Espectro SERS do MB em nanobastões de ouro puros, em verde espectro Raman medido em vidro sem condição de SERS e, em vermelho o espectro medido sob o substrato mostrado grande amplificação do sinal Raman.....	93
Figura 45 - Espectro SERS do CV em diferentes concentrações, medidas no substrato nanoestruturado com GO e nanobastões de Ouro. Em preto o espectro Raman do CV medido em substrato comum de vidro sem a demonstração do efeito SERS. ....	94

Figura 46 - Espectro Raman/SERS do CV (preto), medido na região do infravermelho. Em vermelho o espectro Raman do CV medido em substrato comum de vidro sem a demonstração do efeito SERS.....	95
Figura 47 - Medidas SERS em várias regiões do substrato.....	96
Figura 48 – a) imagem de microscopia ótica da área mapeada, b) Mapeamento SERS em substrato nanoestruturado com GO e nanobastões de Ouro, as regiões em amarelo são pontos de alto aumento de sinal Raman e em preto, regiões onde não é observado amplificação de sinal.....	97
Figura 49 - Mapeamento SERS em substrato nanoestruturado entre GO e nanobastões de ouro, com diferentes distâncias focais: (a) imagem ótica, (b) e (c) mapeamento SERS.....	98
Figura 50 - Espectro SERS do azul de metileno em substrato nanoestruturado. Em preto, espectro Raman medido em vidro e, em Vermelho espectro Raman medido sobre o filme GO/nanobastões de ouro.....	99
Figura 51 - Espectro SERS da Rodamina R6G. Em preto, espectro Raman medido em vidro e, em Vermelho espectro Raman medido sobre o filme GO/nanobastões de ouro.....	99
Figura 52 - Janela de ressonância sobre filme. Mostrando medidas realizadas com diversos comprimentos de onda.....	101
Figura 53 – Efeito SERS químico em filme de GO.....	102
Figura 54 - Substrato formado por nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro.....	103
Figura 55 – (a) Medidas SERS sobre o substrato nanoestruturado formado por nanotubos de carbono e nanobastões de ouro, para a molécula de CV com 1 $\mu$ M de concentração. (b) Variação da intensidade do pico principal da molécula de CV com a concentração. (Inbox: Variação logarítmica da intensidade de sinal do pico principal com a concentração).....	105
Figura 56 - Medidas SERS sobre o substrato nanoestruturado formado por nanotubos de carbono e nanobastões de ouro, para a molécula de MB.....	106
Figura 57 – (a) Espectro SERS para a molécula de CV medido com comprimento de onda de 785 nm, a uma concentração de 1 $\mu$ M, (b) espectro de SERS para a molécula de MB medido com comprimento de onda de 785 nm, a uma concentração de 1 $\mu$ M. Em ambas as figuras o espectro preto representa o sinal Raman medido em substrato comum de vidro sem a demonstração do efeito SERS.....	108
Figura 58 – (a) SEM do anel formado pelo material nanoestruturado e nanobastões de ouro puros. b) os espectros SERS de CV obtido a partir do anel formado pelo material nanoestruturado (vermelho), nanobastões de ouro puro (verde) e nanopartículas de ouro esféricas (Azul).....	109

Figura 59 - Ilustração esquemática do processo de detecção. A interação biológica modifica o raio hidrodinâmico das nanobastões de ouro.....	113
Figura 60 - (a) Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) dos nanobastões de ouro; (b) nanobastão isolado; (c) Histograma mostrando a distribuição do tamanho das nanobastões ouro; (d) Espectro de absorção dos nanobastões de ouro.....	115
Figura 61 - Resultados das medições de dispersão de luz despolarizada com nanobastões de ouro ligados com a proteína BSA.....	117
Figura 62 - Resultado das medidas de espalhamento de luz despolarizada de nanobastões de ouro puros e ligados com anticorpos imunoglobulina E (IgE) e anti-IgE. ....	118

# ABREVIATURAS

LSPR - Localized Surface Plasmon Resonance

ELISA - Enzyme Linked Immune Sorbent Assay

SERS - Surface-enhanced Raman spectroscopy

DLS - Dynamic light scattering

CVD (chemical vapour deposition)

CNT – Carbon Nanotubes

GO – Graphene Oxide

rGO - Reduzed Graphene Oxide

CTAB - Cetyltrimethyl Ammonium Bromide

TEM – Transmission Eletron Microscopy

SEM – Scanning Eletron Microscopy

BSA - Bovine serum albumin

# RESUMO

A detecção de compostos químicos e estruturas biológicas é de grande importância em diversos setores da atividade humana, especialmente em questões de saúde, como por exemplo, em diagnóstico médico. Atualmente, o método mais amplamente utilizado para este fim é o ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay), o qual é baseado na detecção e quantificação de anticorpos específicos. No entanto, este método utiliza protocolos heterogêneos, com muitas etapas distintas e ainda tem baixa sensibilidade e seletividade. Os diversos outros métodos de reconhecimento molecular, geralmente fazem uso de um conjugado entre um receptor e as moléculas ou biomoléculas de interesse, sendo que, em muitos destes métodos, os receptores são acoplados com nanopartículas metálicas que são detectadas por técnicas ópticas. Muitos métodos de detecção química estão sendo estudados recentemente, com destaque para os métodos envolvendo espalhamento de luz, como a espectroscopia Raman, através do chamado efeito SERS, e pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Neste trabalho, foram desenvolvidas duas novas tecnologias de detecção química e biológica baseadas em espalhamento de luz. A primeira utiliza nanocompósitos entre nanomateriais de carbono e nanobastões de ouro como substratos para medidas de espectroscopia Raman através da técnica de SERS. Com estes substratos conseguimos uma amplificação do sinal Raman em ordens de grandeza, o que proporciona uma detecção química ultrasensível na ordem de picomolar de concentração. A segunda tecnologia é uma nova metodologia para detecção específica de anticorpos, baseada na dinâmica rotacional de nanobastões de ouro, através de medidas de espalhamento dinâmico de luz despolarizada. Estas novas tecnologias são mais sensíveis e eficazes que as tecnologias atualmente disponíveis no mercado, possibilitando uma detecção química e biológica mais específica e rápida.

# ABSTRACT

The detection of chemical compounds and biological structures is of great importance in various fields of human activity, especially in matters of health, such as in medical diagnosis. Currently, the most widely used method to this end is the ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay), which is based on the detection and quantification of specific antibodies. However, this method uses heterogeneous protocols, with several distinct steps and still have low sensitivity and selectivity. The various other methods of molecular recognition, usually make use of a conjugate between a receptor and molecules or biomolecules of interest, and in many of these methods, the receptors are coupled with metal nanoparticles that are detected by optical techniques. Many chemical detection methods are being studied recently, especially the methods involving light scattering, such as Raman spectroscopy, through the so-called SERS effect, and the dynamic light scattering technique. In this work, we developed two new technologies of chemical and biological detection based on light scattering. The first uses nanocomposites between carbon nanomaterials and gold nanorods as substrates for Raman spectroscopy measurements by SERS technique. With these substrates it was possible to amplify the Raman signal by orders of magnitude, which provides an ultrasensitive detection chemistry in order to picomolar concentration. The second technology is a new method for specific detection of antibodies based on the rotational dynamics of gold nanorods through dynamic scattering measurements of unpolarized light. These new technologies are more sensitive and effective than currently available technologies in the market, providing a more specific and rapid chemical and biological detection.

# Introdução

---

**Neste capítulo são apresentados os fundamentos teóricos e a revisão bibliográfica deste trabalho**

## 1 – INTRODUÇÃO

## **1.1 - Motivação, problema abordado e estrutura da dissertação.**

---

A nanotecnologia é um campo de pesquisa interdisciplinar que envolve física, química, engenharia, biologia e medicina, com um enorme potencial para diversas aplicações e, como consequência, tem atraído muito interesse da comunidade científica. Nanomateriais de carbono, como, por exemplo, nanotubos de carbono (1), grafeno (2), e óxido de grafeno (3) têm sido extensivamente estudados como materiais promissores para várias aplicações importantes, principalmente devido às suas excelentes propriedades físicas e químicas. Por outro lado, nanoestruturas plasmônicas, como os nanobastões de ouro (4), têm sido amplamente aplicadas devido a suas excelentes propriedades ópticas. Estes materiais são muito interessantes pela facilidade de ligação de moléculas em suas superfícies, e pelo fenômeno de ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR) (5) (6), que são modos eletromagnéticos associados com as oscilações dos elétrons nas superfícies de nanopartículas de metais nobres, devido ao seu confinamento em dimensões de escala nanométrica. Um dos desafios mais importantes em que estes materiais podem ser aplicados é em sensores e biosensores (7), como ilustrado na figura 1.

A detecção de compostos químicos e estruturas biológicas é de grande importância em diversos setores da atividade humana, especialmente em questões de saúde, como por exemplo, em diagnóstico médico. Atualmente o método mais amplamente utilizado para este fim é o ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) (8), o qual é baseado na detecção e quantificação de anticorpos ou antígenos específicos. No entanto, este método utiliza protocolos heterogêneos, com muitas etapas distintas e ainda tem baixa sensibilidade e seletividade. Os diversos outros métodos de reconhecimento molecular, geralmente fazem uso de um conjugado entre um receptor, que pode ser anticorpos, proteínas ou outras biomoléculas, e as moléculas ou biomoléculas a serem detectadas, sendo que, em muitos destes métodos, os receptores são acoplados com nanopartículas metálicas que são detectadas por técnicas ópticas (9).



Figura 1 – Aplicações de nanosensores (Fonte: Criada através de imagens de domínio público)

Biosensores baseados em nanomateriais estão recentemente tendo enorme relevância, principalmente por que o aumento na relação entre área e volume nestes materiais possibilita o aumento significativo da sensibilidade de detecção. Além disto, a possibilidade de funcionalização química de suas superfícies com moléculas e biomoléculas torna possível um sensoriamento mais seletivo. Por outro lado, existem vários métodos espectroscópicos aplicados em química, física e biologia para identificação e estudo de moléculas, entre as mais conhecidas estão a espectroscopia Raman (10) e a espectroscopia de correlação de fótons, também chamada de espalhamento dinâmico de luz, do inglês Dynamic light scattering (DLS) (11). Na espectroscopia Raman, uma impressão digital molecular pode ser identificada pelo espectro vibracional da molécula em estudo. Porém, o sinal Raman de diversas moléculas é muito fraco, sendo de difícil detecção em medidas convencionais. Recentemente, tem sido muito estudado um efeito especial, chamado efeito SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy) (12). Este efeito é caracterizado por uma amplificação do sinal Raman pela interação da molécula em estudo com um substrato nanoestruturado. Desenvolver substratos nanoestruturados para aplicações em SERS, que sejam homogêneos e com grande fator de amplificação de sinal, não é trivial, e vem sendo alvo de intensas pesquisas nos últimos anos (12) (13) (14). Por outro lado, a técnica de espectroscopia de correlação de fótons pode ser aplicada para sensoriamento químico e biológico, por

que é altamente sensível ao movimento dinâmico de nanopartículas em solução, tanto no seu movimento translacional, como no movimento rotacional.

O objetivo deste trabalho é obter novos sensores e biosensores baseados em nanomateriais e seus nanocompósitos, utilizando as técnicas de espectroscopia Raman e espalhamento dinâmico de luz. Para isso foram desenvolvidos substratos SERS com alta qualidade e alto fator de amplificação de sinal Raman, e detectadas diversas moléculas modelo em baixíssimas concentrações. Para os estudos de SERS, foram utilizados nanobastões de ouro e sistemas híbridos entre nanoestruturas de carbono e nanobastões de ouro. A combinação do óxido de grafeno ou nanotubos de carbono, com nanobastões de ouro, forma um material que combina as propriedades químicas das nanoestruturas de carbono, com as propriedades eletromagnéticas dos nanobastões de ouro. Neste trabalho, foi realizada por um novo processo, a formação de nanocompósitos entre nanoestruturas de carbono (nanotubos de carbono e óxido de grafeno) e nanobastões de ouro *in situ*, através de irradiação por luz ultravioleta. O crescimento de nanobastões de ouro ocorre em regiões ativamente funcionalizadas de nanotubos de carbono de paredes múltiplas ou óxido de grafeno, formando um nanomaterial compósito que foi depositado na forma de um filme fino. Este filme fino foi aplicado no desenvolvimento de substratos SERS ativos, com elevada sensibilidade e uma excelente reprodutibilidade e testado para detecção química de diversas moléculas. Neste trabalho, foi utilizada ainda a dinâmica rotacional de nanobastões de ouro para aplicação em detecção química e biológica. Isso foi possível através da funcionalização das extremidades dos nanobastões de ouro com biomoléculas e pela utilização de medidas de espalhamento dinâmico de luz despolarizada. Esse processo resultou em uma nova metodologia de detecção muito seletiva e sensível.

Neste primeiro capítulo será apresentada uma breve introdução sobre a plasmônica, a espectroscopia Raman e como a plasmônica pode ser aplicada para intensificar o sinal Raman (o efeito SERS). Além disto, será discutida a espectroscopia de correlação de fótons, onde será demonstrada como a dinâmica rotacional de nanobastões de ouro pode ser aplicada para biosensoriamento. Nas sessões seguintes, serão apresentados os diversos nanomateriais utilizados neste

trabalho (nanobastões de ouro, nanotubos de carbono, grafeno e seus derivados, etc.). Em seguida será mostrado o estado da arte na formação de híbridos entre estes diferentes nanomateriais e os diferentes mecanismos utilizados neste trabalho para criar substratos SERS e biosensores. Neste trabalho duas diferentes estratégias foram empregadas para o desenvolvimento de substratos SERS, sendo a primeira e mais simples o efeito “*coffee ring*”, que consiste em apenas depositar a solução de nanoestruturas e esperar a evaporação natural do solvente. Esse processo concentra as nanopartículas em um padrão no formato de anel, e resulta em altos fatores de ampliação de sinal via SERS. A segunda estratégia é bem mais sofisticada e consiste na formação de filmes finos, com o objetivo de desenvolver um sistema “mais comercial” para os substratos SERS.

A parte experimental está dividida em três sessões, a primeira começa com a descrição dos processos de síntese dos nanomateriais e sua caracterização, além do processo de formação dos nanocompósitos desenvolvidos durante este trabalho, e os procedimentos de medidas realizados. Na segunda sessão, serão apresentados os resultados do desenvolvimento dos substratos SERS e mostrado os resultados para diferentes moléculas modelo. Na terceira sessão, são apresentados os resultados da aplicação da técnica de espectroscopia de correlação de fótons para detecção biológica, utilizando a dinâmica rotacional de nanobastões de ouro.

## 1.2 - Plasmônica

---

Elétrons e fótons podem coexistir como uma entidade única chamada plasmon - uma excitação elementar de superfície encontrada na interface entre um condutor e um isolante. Essa entidade – Plasmon – deu origem a uma nova área de pesquisa, denominada plasmônica, que trouxe promessas de várias aplicações. A plasmônica se iniciou com as pesquisas de Rufus Ritchie, da Universidade de Tennessee, quando ele estudava a perda de energia que os elétrons apresentavam ao passar por filmes metálicos. Experiências da época demonstravam que essa perda era

quantizada, já que o espectro tinha linhas igualmente espaçadas, indicando que a perda poderia estar seguindo múltiplos inteiros de uma entidade fundamental. David Pines e David Bohm propuseram a ideia de que oscilações coletivas do plasma de elétrons no metal eram responsáveis pelas linhas no espectro de perda de energia (15), e em 1957 Pines introduziu o termo “Plasmon” para se referir à nova entidade fundamental (16):

*“As oscilações coletivas dos elétrons de valência se assemelham as oscilações de plasma eletrônicas observadas em descargas gasosas. Nós introduzimos o termo “plasmon” para descrever o quantum de excitação elementar associado a este movimento coletivo de alta frequência”.<sup>1</sup>*

No ano seguinte Ritchie, estudando a dependência angular e de espessura do filme em experimentos de perda de energia dos elétrons, descobriu ondas de densidade de carga que se propagavam na interface metal/dielétrico (17), o que foi confirmado experimentalmente em 1959 (18) e chamados de *plasmons de superfície* (19). O estudo deste fenômeno ganhou força em 1968, com o trabalho de Andreas Otto, Erich Kretschmann e Heinz Raether, que desenvolveram métodos para a excitação óptica de plasmons de superfície em filmes de metal, tornando as experiências com os plasmons muito mais simples (20) (21). Plasmons são oscilações coletivas de elétrons de condução na interface entre um condutor e não condutor. Se excitado por fótons, plasmons representam um modo de elétron-fóton “híbrido” confinado a um condutor. Esse movimento de carga cria campos eletromagnéticos externos e internos, e são caracterizados por extremamente altas intensidades de campo elétrico. Dois fenômenos são possíveis: se a excitação estiver confinada na interface condutor/dielétrico em uma superfície plana, ela recebe o nome de *surface plasmon polariton* e, se a excitação se confina na superfície fechada de uma pequena partícula, recebe o nome de *localized surface plasmon*. Na figura 2 temos uma representação destes dois efeitos. As pesquisas destes efeitos foram aplicadas para desenvolver novas técnicas que vem sendo extremamente úteis em várias áreas de pesquisa (22). Neste trabalho, será destacado o formalismo para a ressonância de plasmon de superfície localizado.

---

<sup>1</sup> Extraído e traduzido da referência 15.

Mais estudos e informações sobre Surface plasmon polariton, podem ser encontradas nas referências (23) e (24).

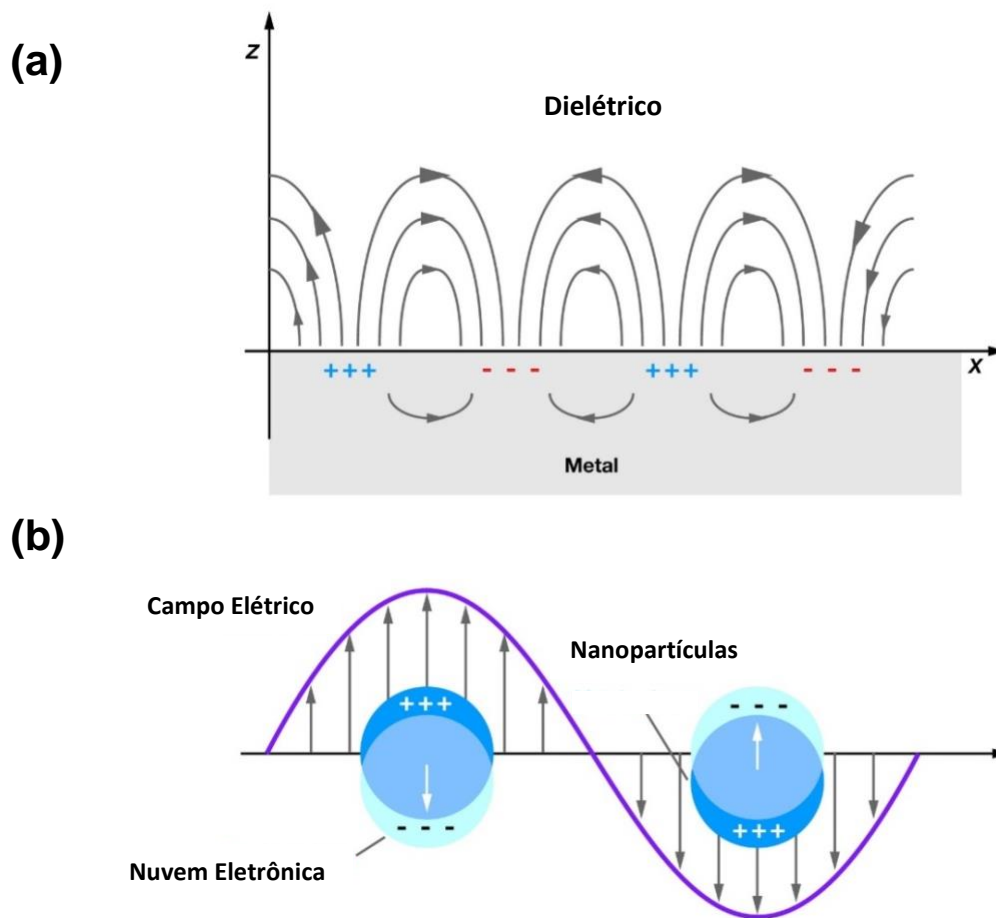


Figura 2 - Ilustrações mostrando os dois tipos de ressonância de plasmon, em a) *surface plasmon polariton*, plasmons que se propagam na interface entre um dielétrico e um metal e em (b) o *localized surface plasmon*, ressonância de plasmon de superfície localizada, oscilação coletiva dos elétrons em nanopartículas metálicas. (Modificado e reproduzido com permissão de referência **(22)** (Willets and Van Duyne, 2007)).

A ressonância de plasmon de superfície localizada são excitações de plasmons em nanoestruturas metálicas que não se propagam. No caso de pequenas partículas de metal isoladas, com tamanhos da ordem da profundidade de

penetração de um campo eletromagnético e menores que os comprimentos de onda de excitação, a distinção entre plasmons de superfície e de volume desaparece. Um campo externo pode penetrar no volume e deslocar a nuvem de elétrons de condução. No caso de nanopartículas temos dois casos importantes: pequenas partículas esféricas e partículas não esféricas. Para tal precisamos determinar a condição de ressonância analisando a função dielétrica do material e como calcular a absorção óptica e sua variação em função da morfologia. Precisamos ainda determinar como o campo elétrico criado em volta da partícula pela ressonância de plasmon se comporta dependendo da morfologia, o que é muito importante para compreender o efeito SERS. O tratamento é simples e é descrito a seguir.

### 1.2.1 - Propriedades ópticas dos metais – Modelo de Drude.

Para estudar as propriedades ópticas dos metais utilizamos o modelo de Drude. Neste modelo assumimos que os metais se comportam como plasma, ou seja, um gás de elétrons livres, de densidade  $N$ , que se propaga livremente por trás de um fundo de núcleos positivamente carregados. Estes elétrons oscilam na presença de um campo elétrico  $E(t) = E_0 e^{-i\omega t}$  de frequência de oscilação  $\omega$ , e são amortecidos por meio de colisões com a rede cristalina do material a uma taxa  $\gamma$ . A função dielétrica de metal é derivada das equações do movimento para um elétron livre. As equações de movimento neste modelo são:

$$m\ddot{X} + m\gamma\dot{X} = -eE(t) \quad (1)$$

$$X(t) = \frac{e}{m(\omega^2 + i\gamma\omega)} E(t) \quad (2)$$

Onde  $m$  é a massa dos elétrons e  $\gamma$  é a taxa de amortecimento das oscilações. Como os elétrons se deslocam em relação à rede de núcleos positivos, eles geram uma polarização dada por  $P = -NeX$ , e pelo eletromagnetismo clássico podemos introduzir o conceito de vetor deslocamento elétrico  $D$ , dado pela equação 3.

$$D = \varepsilon_0 E + P = \varepsilon_0 \epsilon E \quad (3)$$

Onde  $\varepsilon_0$  é a permissividade do vácuo (também chamada de permissividade do espaço livre) e  $P$  é a polarização que é definida como a densidade macroscópica de

momento de dipolo elétrico permanente induzido no material. Com esses conceitos e utilizando as equações 1 a 3, podemos calcular a função dielétrica, dada pela equação 4,

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (4)$$

Onde: 
$$\omega_p^2 = \frac{Ne^2}{\epsilon_0 m} \quad \gamma = \frac{1}{\tau} \quad (5)$$

Da equação 4 obtemos as partes real e imaginária da constante dielétrica,

$$\epsilon'(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} \quad (6)$$

$$\epsilon''(\omega) = \frac{\omega_p^2 \gamma}{\omega(\omega^2 + \gamma^2)} \quad (7)$$

Nestas equações,  $\omega_p$  é a frequência de oscilação coletiva dos elétrons.

A variação da parte real e da parte imaginária estão plotadas na figura 3 onde observamos que a parte real só não é desprezível na frequência de ressonância  $\omega_o$ . Como a parte imaginária é relacionada com a absorção óptica do material, isso significa que só existe absorção quando  $\omega = \omega_o$ . Estes dados são importantes para calcularmos os espectros de absorção óptica de nanopartículas metálicas quando excitadas com radiação eletromagnética. Temos duas situações para serem analisadas, pequenas partículas esféricas e partículas não esféricas.

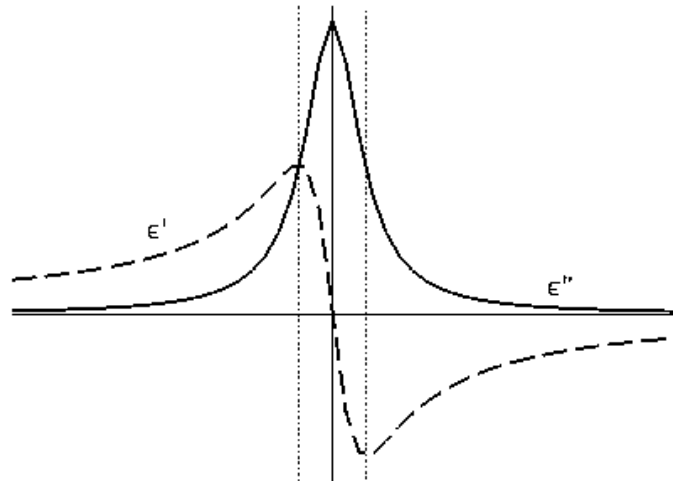


Figura 3 - Dependência espectral das partes real e imaginária da função permissividade (Fonte: <http://web.missouri.edu/~speckan/witch-stuff/Research/chapter4/node7.html>)

#### 1.2.1.1 - Ressonância de plasmon em pequenas partículas esféricas.

Como aproximação consideramos as nanopartículas, como sendo, esferas de raio ( $a$ ) em um campo elétrico estático uniforme  $E_{in} = E_{out}$ , onde o meio circundante é isotrópico e não absorvente, com constante dielétrica  $\epsilon_m$ , sendo que a esfera de metal é descrita por uma constante dielétrica complexa  $\epsilon$ . Em coordenadas esféricas, a equação de Laplace é mostrada na equação 8 e sua solução para obter o campo elétrico é descrita a seguir.

$$\frac{1}{r^2 \sin\theta} \left[ \sin\theta \partial_r (r^2 \partial_r) + \partial_\theta (\sin\theta \partial_\theta) + \frac{\partial_\phi^2}{\sin\theta} \right] \Phi(r, \theta, \phi) = 0 \quad (8)$$

As seguintes soluções são possíveis devido à simetria azimutal:

$$\Phi(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} A_l r^l P_l \cos \theta \quad (9)$$

$$\Phi_m(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} (B_l r^l + C_l r^{-l-1}) P_l \cos \theta \quad (10)$$

Onde  $\Phi$  é o potencial dentro da esfera,  $\Phi_m$  o potencial no exterior da esfera,  $A_l$  e  $B_l$  são coeficientes a serem determinados e  $P_l$  são polinômios de Legendre. Aplicando as condições de contorno,

$$\Phi(r, \theta)_{int} = \Phi(r, \theta)_{ext} \quad (11)$$

$$\epsilon \frac{\partial \Phi(r, \theta)_{int}}{\partial r} = \epsilon_m \frac{\partial \Phi(r, \theta)_{ext}}{\partial r} \quad (12)$$

$$\lim_{r \rightarrow \infty} \Phi(r, \theta)_{ext} = -E_0 z = -E_0 \cos \theta \quad (13)$$

Temos,

$$\Phi(r, \theta) = -\frac{3\epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} E_0 r \cos \theta \quad (14)$$

$$\Phi_m(r, \theta) = -E_0 r \cos \theta + \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} E_0 \frac{a^3}{r^2} \cos \theta = -E_0 r \cos \theta + \frac{\mathbf{p} \cdot \mathbf{r}}{4\pi\epsilon_0\epsilon_m r^3} \quad (15)$$

Onde a polarização é dada por,

$$\mathbf{p} = 4\pi\epsilon_0\epsilon_m a^3 \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} E_0 \quad (16)$$

Pela equação de Laplace os campos elétricos são:

$$\mathbf{E} = \frac{3\epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} E_0 \quad (17)$$

$$\mathbf{E}_m = E_0 + \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_m} \frac{3n(n.p) - p}{r^3} \quad (18)$$

A polarizabilidade é dada pela expressão:

$$\alpha = 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_m a^3 \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \quad (19)$$

Pelas equações deduzidas, podemos perceber que a polarizabilidade descrita na equação 19 e o campo elétrico descrito pela equação 17 têm uma frequência de ressonância característica na condição de ressonância dada por:

$$\varepsilon + 2\varepsilon_m = 0 \quad (20)$$

Essa é a condição de ressonância de plasmon da nanopartícula. Essa condição é muito importante para este trabalho, já que nas proximidades dela o campo elétrico criado pelas nanopartículas é amplificado em ordens de magnitude.

Pela teoria de Mie e com a expansão das equações para os campos elétricos, podemos determinar as expressões para os coeficientes de extinção para o espalhamento e a absorção. Estas expressões são apresentadas nas equações 21 e 22 e o formalismo completo destas deduções pode ser encontrado na referência (25).

$$\sigma_{Espalhado} = \frac{k^4}{6\pi\varepsilon_0^2} |\alpha(\omega)|^2 = \frac{8\pi}{3} k^4 a^6 \left| \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right|^2 \quad (21)$$

$$\sigma_{Absorvido} = \frac{k}{\varepsilon_0} \text{Im}|\alpha(\omega)| = 4\pi k a^3 \text{Im} \left| \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right| \quad (22)$$

Pelas equações observamos que, para partículas grandes o espalhamento predomina, e para as partículas pequenas a absorção domina. Destas equações, podemos determinar os espectros de absorção óptica de soluções de nanopartículas metálicas e, como será visto adiante, sua diferença em relação à morfologia da partícula.

### 1.2.1.2 - Ressonância de plasmon em pequenas partículas não esféricas.

No caso de partículas não esféricas, o mesmo tratamento pode ser utilizado, porém a morfologia da partícula deve ser aproximada para uma elipsoide e aplicada à aproximação quase estática (26) (27). Neste caso a polarizabilidade é dada por:

$$\alpha_i = 4\pi abc \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{3\varepsilon_m + 3L_i(\varepsilon - \varepsilon_m)} \quad (23)$$

Onde  $L_i$  é chamado de fator de despolarização. Este fator entra na equação porque nestes cálculos o formato cilíndrico é aproximado por um elipsoide, sendo este fator determinado de acordo com as dimensões a, b e c ao longo dos três eixos principais.  $L_i$  é então dado por três componentes,  $L_a$ ,  $L_b$  e  $L_c$  conforme equações abaixo.

Sendo:

$$L_a = \frac{abc}{2} \int_0^\infty \frac{dq}{(a^2 + q)f(q)} \quad (24)$$

$$L_b = \frac{abc}{2} \int_0^\infty \frac{dq}{(b^2 + q)f(q)} \quad (25)$$

$$L_c = 1 - L_a - L_b \quad (26)$$

$$F(q) = \{(q + a^2)(q + b^2)(q + c^2)\}^{1/2} \quad (27)$$

Onde a, b e c são as dimensões ao longo dos três eixos do elipsoide. Podemos usar este desenvolvimento para o caso de nanopartículas de morfologia cilíndrica, e através das equações para as sessões de choque de espalhamento e absorção (equações 21 e 22), é possível determinar os espectros de absorção para morfologias esféricas e cilíndricas como mostrado na figura 4 (28).

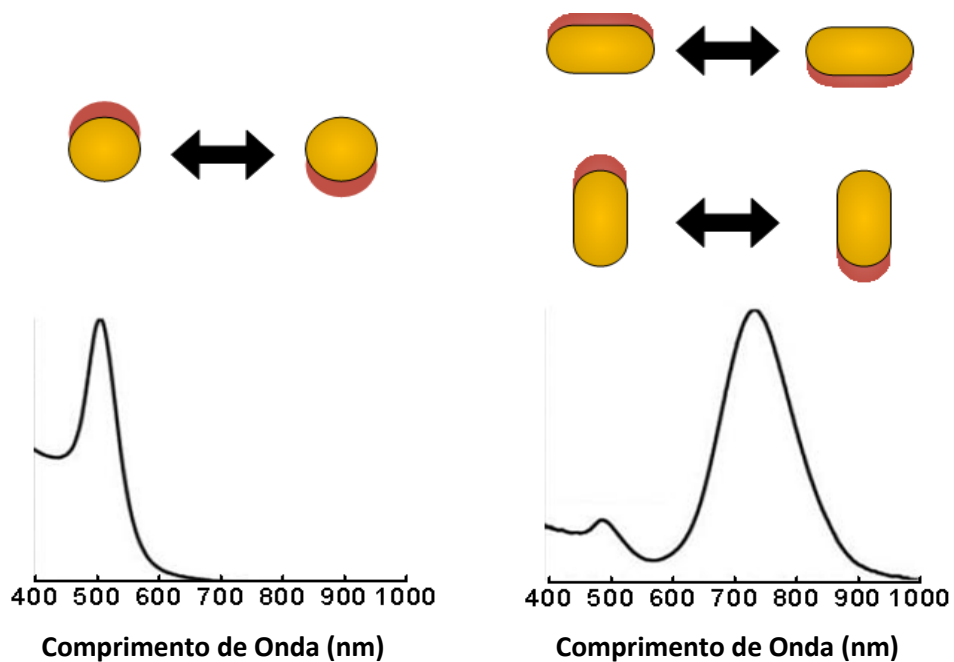


Figura 4 - Efeito da morfologia das nanopartículas em seu espectro de absorção óptica. (Modificado e reproduzido com permissão da referência **(28)**)

Pela figura 4, percebemos que a alteração da morfologia das nanopartículas provoca grandes mudanças no espectro de absorção óptica. No espectro de nanopartículas esféricas é observado apenas um pico de absorção devido ao plasmon, que para o caso de nanopartículas de ouro está situado em torno de 520 nm (400 nm caso sejam nanopartículas de prata). Isso é devido à simetria da partícula, o elétron só tem uma direção preferencial de movimento. Por outro lado, quando estamos trabalhando com nanobastões de ouro, temos dois picos de ressonância de plasmon, um devido à oscilação coletiva dos elétrons nas extremidades dos nanobastões, este sendo chamado de plasmon transversal, e outro pico, mais intenso, devido à ressonância de plasmon ao longo do comprimento dos nanobastões, sendo este chamado de plasmon longitudinal.

Adiante neste mesmo capítulo será apresentado mais detalhes das propriedades ópticas de nanopartículas em morfologias anisotrópicas.

## 1.3 - Espectroscopia Raman

O efeito Raman foi descoberto por Sir Chandrasekhara Venkata Rāman em 1923 (29), ao observar que, quando um feixe de luz monocromático intenso de frequência ( $f$ ) atravessa um meio material, a luz espalhada mostra além da radiação de mesma frequência que a luz incidente (espalhamento Rayleigh) uma série de novas linhas extremamente fracas. Com esta importante descoberta e sua explicação, ele foi premiado com o Nobel de Física de 1930. Com a descoberta dos lasers em 1960, difundiu-se a espectroscopia Raman (30), que hoje é amplamente utilizada em vários campos de pesquisa, com um grande destaque para a pesquisa de nanomateriais (31).

Quando incidimos um feixe de luz em um material, ele pode ser espalhado elástica (espalhamento Rayleigh) ou inelasticamente. O efeito Raman consiste no espalhamento inelástico da luz, em que as diferenças de energia entre a luz incidente e a luz espalhada dependem das propriedades vibracionais das moléculas do material. Dois processos distintos são possíveis, o Stokes e o Anti-Stokes. O primeiro ocorre quando há uma redução da energia do fóton espalhado, por causa do aumento da energia vibracional do material, e o segundo ocorre quando a energia do fóton espalhado aumenta quando da diminuição da energia vibracional. Na figura 5 estão ilustrados estes processos.

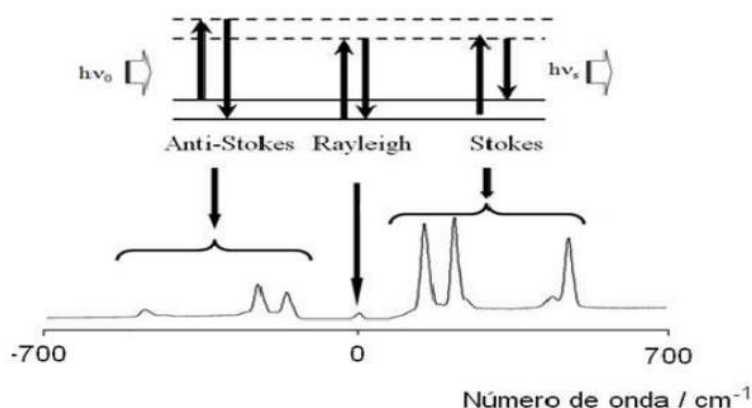


Figura 5 - Explicação do efeito Raman em níveis de energia. Adaptado da referência (32).

A espectroscopia Raman estuda então os modos de vibração das moléculas, ou seja, os movimentos dos seus átomos no material. Estas moléculas podem ter  $3N-6$  coordenadas, que descrevem seu movimento, já excluindo os movimentos de translação e rotação. Quando uma molécula é então irradiada com luz de certo comprimento de onda, é induzido nela um momento de dipolo, devido os deslocamentos periódicos dos seus átomos, e a molécula é então polarizada como mostra a equação 28, onde  $\alpha_o$  é a polarizabilidade da molécula e  $E_o$  o campo elétrico de excitação.

$$P = \alpha_o E_o \cos 2\pi\nu t \quad (28)$$

Porém, a polarizabilidade pode variar como mostrado na equação 29 e, neste caso, teremos duas novas frequências. Essa variação da polarizabilidade é a responsável pelo efeito Raman, e é o que o diferencia da espectroscopia no infravermelho, cuja característica é uma mudança no momento de dipolo da molécula.

$$P = \left(\alpha_o + \frac{\partial\alpha}{\partial x} x\right) E_o \cos 2\pi\nu t \quad (29)$$

Como as moléculas são complexas e com diversas frequências de vibração diferentes, medidas de espectroscopia Raman têm vários picos correspondendo às frequências de vibração molecular. Como cada molécula tem uma estrutura molecular característica, o espectro Raman é específico para cada uma delas, sendo uma assinatura molecular que torna possível sua identificação. A espectroscopia Raman é então uma técnica muito importante em diversas aplicações, tanto acadêmica como industriais. Porém, como citado anteriormente, o sinal Raman é muito fraco, o que dificulta aplicações importantes, como por exemplo, a obtenção de espectros Raman de proteínas e outras biomoléculas (33).

## 1.4 - SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy)

---

*“The most spectacular application of plasmonics”<sup>2</sup>*

O efeito SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy), descoberto por Richard Van Duyne em 1976 (34), tem sido extensivamente estudado, porque é uma técnica altamente sensível, que abre a possibilidade de detectar moléculas em concentrações extremamente baixas, e mesmo ao nível de molécula única (35) (36). Isso despertou o interesse na sua utilização para biosensoriamento (37) (38). Muitos estudos têm sido realizados para explicar o efeito SERS, agora sabemos que ele se origina de dois mecanismos principais (39) (40), o químico (41) e o eletromagnético (42). Em experimentos SERS, a equação 28 para o dipolo Raman, reescrita na equação 30, pode ser modificada para a equação 31. Nestas equações,  $\alpha_o^R$  é a polarizabilidade da molécula,  $\alpha^R$  é a polarizabilidade da molécula após a interação com o substrato SERS,  $E_o$  é o campo elétrico do laser excitação e  $E_{Local}$  o campo elétrico resultante da soma do campo elétrico do laser de excitação com o campo elétrico criado em torno das nanopartículas.  $\omega_L$  e  $\omega_R$  são as frequências do laser de excitação e dos modos vibracionais das moléculas, respectivamente.

$$\mathbf{p}_o(\omega_R) = \alpha_o^R(\omega_L, \omega_R)\mathbf{E}_o(\omega_L) \quad (30)$$

$$\mathbf{p}(\omega_R) = \alpha^R(\omega_L, \omega_R)\mathbf{E}_{Local}(\omega_L) \quad (31)$$

Pelas equações 30 e 31, podemos identificar duas origens para a modificação do sinal Raman durante os experimentos SERS, a primeira é a modificação da polarizabilidade da molécula e a segunda a alteração do campo elétrico que passa a ser o campo local, ou seja, a soma do campo incidente com o campo criado pelas nanoestruturas plasmônicas. O primeiro efeito aparece devido a mecanismos de troca de carga entre o substrato e a molécula em estudo, e é chamado de efeito químico, sendo devido a qualquer efeito que possa alterar a polarizabilidade Raman em condições SERS em comparação a experimentos sem SERS. Existem muitas formas diferentes nas quais a polarizabilidade pode ser modificada pela presença do substrato metálico. Por exemplo, uma interação fraca pode resultar em uma

---

<sup>2</sup> Extraído da referência (5)

perturbação da densidade eletrônica da molécula e assim provoca alterações na sua polarizabilidade. Interações fortes com o substrato (covalente) podem resultar na modificação da estrutura eletrônica da molécula, o que leva ao aparecimento de processos de transferência de carga (43) que também contribuem para o efeito químico em SERS. O enhancement químico é fortemente dependente da molécula em estudo, visto que reflete a interação físico-química da molécula com o substrato.

Já o “enhancement eletromagnético” se aplica a todas as moléculas, uma vez que é originado da interação entre elas e o intenso campo elétrico criado pela ressonância de plasmon em torno de nanoestruturas metálicas. Isto é devido ao fenômeno da ressonância de plasmons de superfície localizado (LSPR) de nanopartículas de metais nobres, que são modos eletromagnéticos associados com as oscilações dos elétrons em suas superfícies, devido à sua escala de dimensão nanométrica. Esse fenômeno de ressonância de plasmons faz com que essas nanoestruturas metálicas se comportem como "nanoantenas", ampliando os campos eletromagnéticos em torno de sua superfície (44). Especialmente quando a molécula de interesse está localizada entre duas nanopartículas, é produzido um campo extremamente forte chamado de "Hot-Spot" (6) (45) (46), condição em que o efeito SERS é máximo.

A fabricação de substratos SERS ativos, homogêneos e reproduzíveis não é trivial e está sendo amplamente estudada (12) (47) (48). Muitos substratos foram relatados com diferentes métodos de preparação e os nanomateriais mais diversos (49) (50). Nanoestruturas metálicas de várias morfologias são usadas em substratos SERS, como por exemplo, nanopartículas de ouro (51), nanobastões de ouro (52), nanoestrelas de ouro (53), nanocarambolas de ouro (54), entre outros. Nanobastões de ouro (4) são de particular interesse devido às suas excelentes propriedades plasmônicas e sua grande promessa em muitas aplicações. Vários estudos recentes têm mostrado que os nanobastões de ouro são excelentes substratos para SERS devido ao forte aumento de campo elétrico nas suas extremidades, causado pela alta curvatura e a possibilidade de ajustar o valor de ressonância de plasmon de superfície em uma ampla faixa espectral, tornando mais fácil a combinação com os lasers de excitação disponíveis.

## 1.5 - Dynamic light scattering (DLS)

---

Espalhamento dinâmico de luz, também chamado de Espectroscopia de Correlação de Fótons (11), é uma técnica usualmente utilizada para medir o tamanho de partículas. A técnica de DLS, do inglês Dynamic light scattering, atua medindo o movimento Browniano e correlacionando-o com o tamanho das partículas. Movimento browniano é um movimento aleatório de partículas devido à interação com as moléculas do fluido em volta delas. Quanto maior for a partícula, mais lento será o seu movimento browniano, por outro lado, quanto menores forem as partículas, mais rápido será o seu movimento, devido à maior interação com o meio a sua volta. Através da dinâmica da partícula no fluido é possível determinar seu tamanho utilizando a equação de Stokes-Einstein;

$$R = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (32)$$

R = Diâmetro hidrodinâmico

D = Coeficiente de difusão de translação

k = Constante de Boltzmann

T = Temperatura absoluta

$\eta$  = Viscosidade

O diâmetro medido é o diâmetro hidrodinâmico, ou seja, refere-se ao modo como uma partícula se difunde dentro de um fluido e está relacionado ao coeficiente de difusão de translação. O coeficiente de difusão de translação dependerá não só do tamanho da partícula, mas também da estrutura de sua superfície, da temperatura e da viscosidade do fluido. Qualquer modificação da superfície de uma partícula que afeta a sua velocidade de difusão irá modificar o tamanho aparente da partícula. Outra consideração é sobre a morfologia das partículas, pois o tratamento matemático para partículas não esféricas é mais complicado. A esfera é o único objeto cujo tamanho pode ser facilmente determinado com o uso da técnica de espalhamento dinâmico de luz.

O diâmetro hidrodinâmico de uma partícula não esférica é o diâmetro de uma esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão. Se a forma de uma partícula sofre mudanças que afetam sua velocidade de difusão, o tamanho hidrodinâmico também será alterado. Por outro lado, medidas de DLS também podem ser realizadas por uma componente não polarizada da luz que permite a avaliação tanto da difusão translacional, como da difusão rotacional. Como resultado, a dispersão de luz despolarizada pode ser utilizada para obter o raio hidrodinâmico da esfera equivalente, o comprimento real e o diâmetro de difusão de partículas não esféricas, como as de morfologia cilíndrica, como é o caso dos nanobastões de ouro.

Em espalhamento dinâmico de luz, a velocidade em que as partículas estão se difundindo devido ao movimento Browniano é medida através da medida da flutuação da intensidade de dispersão da luz. Para um sistema de partículas em movimento browniano, um padrão é observado sempre que a posição estiver em constante movimento. Isto porque a fase das partículas que se movem está em constante evolução havendo a formação de novos padrões. A taxa na qual a flutuação de intensidade vai ocorrer depende do tamanho das partículas. A Figura 6 ilustra esquematicamente flutuações de intensidade para uma dispersão de partículas grandes e uma dispersão de partículas pequenas. As pequenas partículas fazem com que a intensidade flutue mais rapidamente do que as grandes. A melhor maneira de analisar a flutuação é com um dispositivo chamado correlacionador, que é basicamente um dispositivo de comparação de sinais, destinado a medir o grau de semelhança entre dois sinais distintos e em diferentes intervalos de tempo. Se a intensidade de um sinal é comparada com um ponto particular no tempo e em um tempo muito distante, uma flutuação aleatória das intensidades do sinal é evidente e eles não estarão relacionados, isto é, não haverá nenhuma correlação entre os dois sinais.

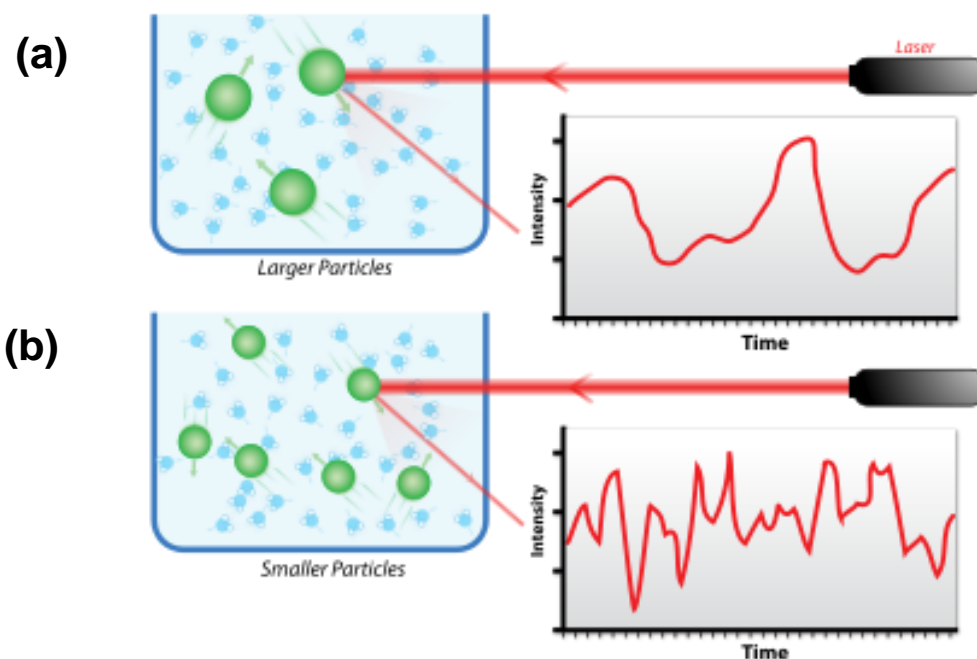


Figura 6 - Espalhamento de luz em nanopartículas de diferentes diâmetros (Fonte: Referência (55))

Para determinar as dimensões de nanopartículas pela técnica de espalhamento de luz, a intensidade do sinal espalhado em um tempo ( $t$ ) é comparada com a intensidade do sinal espalhado em um tempo infinitesimal depois ( $t + \Delta t$ ). Haverá uma forte relação entre as intensidades dos dois sinais, ou seja, eles estarão correlacionados. Se o sinal em ( $t$ ) é comparado com o sinal em ( $t + 2\Delta t$ ), haverá uma relação reduzida entre os dois sinais. O período de tempo  $\Delta T$  é geralmente muito pequeno, da ordem de nanossegundos ou microssegundos e é chamado o tempo de amostra do dispositivo de correlação. Se as partículas são grandes, o sinal muda muito lentamente e a correlação irá persistir por um longo tempo (figura 6a). Se as partículas são pequenas e estão movendo-se rapidamente, a correlação irá reduzir mais rapidamente (figura 6b). O momento em que a correlação começa a ter um decaimento significativo é uma indicação da dimensão média das partículas. A função de correlação, visto que as partículas estão em uma dispersão com constante movimento Browniano aleatório, faz com que a intensidade da luz seja

dispersa e flutua como uma função do tempo. O correlacionador irá construir a função de auto-correlação  $G(\tau)$  da intensidade (equação 33) que mede o grau de dependência entre os sinais em  $I(t)$  e  $I(t + \tau)$ .

$$G(\tau) = \langle I(t).I(t + \tau) \rangle \quad (33)$$

Onde  $\tau$  é a diferença de tempo (o tempo de amostra) do dispositivo de correlação. Para um grande número de partículas em movimento browniano, a função de correlação (dado o símbolo  $[G]$ ) é uma função de decaimento exponencial, onde  $\Gamma$  é a taxa de decaimento relacionada à frequência de relaxação do movimento da partícula, e  $\tau$  é o intervalo de tempo entre as correlações.

$$G(\tau) = [1 + \exp(-2\Gamma\tau)] \quad (34)$$

Onde

$\Gamma = Dq^2$  em que  $D$  = coeficiente de difusão translacional

$$q = (4\pi n/\lambda_0)\sin(\theta/2)$$

Sendo  $q$  o vetor de espalhamento,  $n$  = índice de refração do fluido,  $\lambda_0$  = comprimento de onda de excitação,  $\theta$  = ângulo de dispersão.

Como o coeficiente de difusão translacional está associado à taxa de decaimento, é possível determiná-lo. Aplicando a equação de Stokes-Einstein é possível então calcular o raio hidrodinâmico das partículas no fluido. A obtenção de informações de tamanho a partir da função de correlação é conseguida usando vários algoritmos.

## 1.6 - Nanomateriais

### 1.6.1 - Nanomateriais de carbono

O carbono tem a capacidade de fazer diferentes ligações químicas de modo a criar estruturas com propriedades completamente diferentes, como por exemplo, o grafite e o diamante. Isto ocorre porque no átomo de carbono, com configuração eletrônica  $1s^2, 2s^2, 2p^2$ , os orbitais de valência  $2s$  e  $2p$  podem se misturar para formar três orbitais híbridos:  $sp^1$ ,  $sp^2$  e  $sp^3$ . Essa versatilidade do carbono fez surgir vários tipos de estruturas bem distintas e interessantes. Na figura 7, temos diferentes nanomateriais formados por diversas formas de organização dos átomos de carbono, tais como nanotubos de carbono (1), grafeno (2), fullereno (56). Existem outros materiais interessantes formados também por diferentes organizações dos átomos de carbono, tais como, nanopartículas de carbono fluorescentes (57) e nanodiamantes (58), que têm sido estudados e têm uma ampla gama de potenciais aplicações.

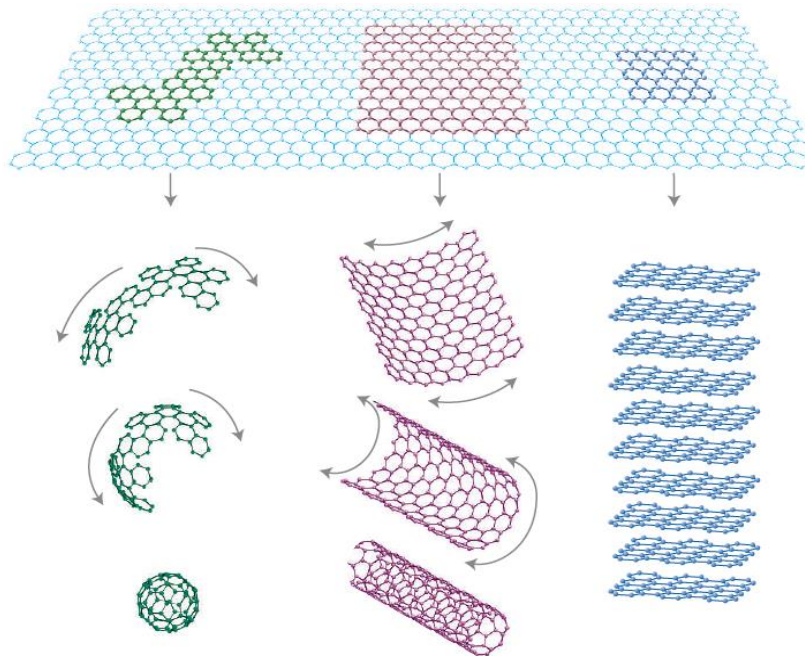


Figura 7 - Diferentes tipos de nanomateriais de carbono [reproduzido com permissão de Nature Materials] (2).

O fullereno C<sub>60</sub> (56), também chamado de *buckyballs*, foi descoberto por Richard Smalley e Kroto em 1985 (59), pelo qual foram premiados com o prêmio Nobel de química em 1996. Este material é formado por estruturas fechadas, convexas, compostas por faces pentagonais e hexagonais, formadas por átomos de carbono com hibridização sp<sup>2</sup> (Figura 7). Em 1991, Sumio Iijima, tentando produzir fullerenos, descobriu os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (60), sendo que ele iria descobrir os nanotubos de parede simples dois anos mais tarde (61).

Os nanotubos de carbono têm grande interesse científico e tecnológico devido às suas propriedades extraordinárias, como por exemplo, elevada resistência mecânica (força específica 48,5 x 10<sup>3</sup> KN.m. Kg<sup>-1</sup>) (Módulo de Young >1000 GPa), alta condutividade térmica (~6000 W.m<sup>-1</sup>. K<sup>-1</sup>), flexibilidade, alta área específica e propriedades eletrônicas únicas, podendo apresentar caráter metálico ou semicondutor dependendo da organização atômica. Em relação a sua estrutura, eles podem ser de três tipos, *zigzag*, *armchair* ou *chiral*. Muito importante nos nanotubos de carbono é a capacidade de modificação química de sua superfície, sendo que acoplamentos covalentes e não covalentes são possíveis, o que gera interessantes aplicações em biologia. A funcionalização dos nanotubos de carbono será abordada mais adiante neste trabalho.

O grafeno (Novoselov *et al*, 2004; Geim Novoselov, 2007) (2), descoberto em 2004 e concedido aos seus descobridores o prêmio Nobel de Física em 2010, é uma folha monocamada de átomos de carbono com hibridação sp<sup>2</sup>, produzido pelas técnicas de esfoliação mecânica ou química de grafite, ou por meio do método de deposição química em fase vapor ou CVD do inglês Chemical Vapour Deposition (62). Este nanomaterial possui excelentes propriedades eletrônicas, ópticas, térmicas, mecânicas e químicas e, pela virtude de sua biocompatibilidade, tem aplicações potenciais em nanomedicina. O grafeno apresenta uma grande área teórica de superfície específica (2630 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>) (62), os elétrons viajam como se eles não carregassem nenhuma massa, o que significa que tem uma alta mobilidade (200 000 cm<sup>2</sup>v<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) (63), e podem transferir energia para as moléculas próximas (62). A sua condutibilidade térmica é isotrópica e é muito mais elevada do que o valor observado em todas as outras nanoestruturas de carbono (~5000 Wm<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>) (64). Mecanicamente, o grafeno parece ser um dos materiais mais fortes já testados, com

módulo de Young de  $\sim 1.0$  TPa (65), com alta elasticidade, flexibilidade e adaptabilidade para superfícies planas ou irregulares (62). Além disso, é altamente transparente à luz visível (Transmitância de  $\sim 97,7$ ). Devido a essas ótimas propriedades físicas e químicas, o grafeno tem ampla aplicação em diversas áreas, como nanoeletrônica, optoeletrônica, sensores, painéis fotovoltaicos e biotecnologia, como pode ser encontrado no recente trabalho de revisão de Ferrari *et al* (62). Recentemente, vêm se destacando materiais derivados do grafeno, tais como, óxido de grafeno (GO) (66), óxido de grafeno reduzido (rGO) (67) e Nano-GO (68).

### 1.6.2 - Óxido de grafeno (GO)

Óxido de grafeno (GO) é um derivado do grafeno, normalmente obtido por meio de tratamento químico de grafite em meio ácido. GO tem características que são muito diferentes das do grafeno devido à presença de diversos grupos contendo oxigênio em sua superfície (-C-O-C-, C-O-H, -COOH, etc.) (Figura 8b), o que torna este material negativamente carregado. Isso faz com que o GO seja solúvel em água ou outros solventes polares. No entanto, sua solubilidade em ambientes orgânicos pode ser melhorada por modificação química.

No entanto, ele ainda apresenta as excelentes propriedades do grafeno, sendo mecanicamente forte, flexível, transparente e biocompatível, principalmente devido à sua natureza hidrofílica. Diversos métodos já foram publicados sobre a produção de óxido de grafeno, sendo que métodos mais comuns são os de Brodie (69), de Staudenmaier (70), e o Método de Hummers (71), todos envolvendo a oxidação do grafite para obter grupos hidrofílicos sobre a superfície das folhas de GO formadas. Em particular, uma combinação de clorato de potássio (KClO<sub>3</sub>) e ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) é utilizada para oxidar grafite nos métodos de Brodie e Staudenmaier, enquanto permanganato (KMnO<sub>4</sub>) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) são usados no método de Hummers. Depois do processo de oxidação, o produto resultante deve ser esfoliado para obter as folhas de GO, usando ultra-sonicação.

### 1.6.3 - Óxido de grafeno reduzido (rGO)

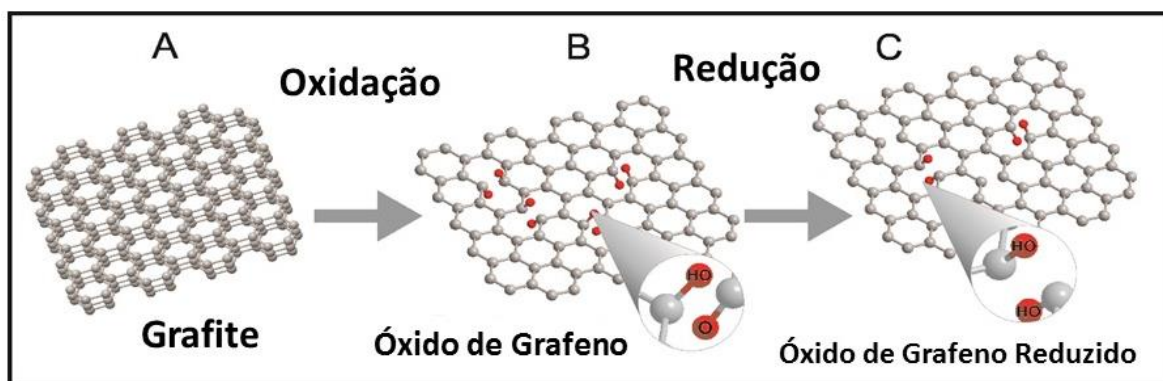


Figura 8 - Processo de formação do óxido de grafeno reduzido.

Como citado anteriormente, o óxido de grafeno contém diversos grupos contendo oxigênio em sua superfície. Em 2007, Ruoff *et al* (72) obtiveram grafeno, reduzindo o GO com hidrazina a 100 °C por 24 horas. A redução química do óxido de grafeno o torna mais hidrofóbico. A redução do GO, com hidrazina resultou em deslaminação e pirólise dos grupos funcionais contendo oxigênio, resultando em folhas de grafeno. Esta redução química pode ser obtida com vários outros agentes redutores, tais como hidroquinona, boridreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) e ácido ascórbico.

#### 1.6.4 - Nanobastões de Ouro

*“A super star in the field of nanotechnology”*<sup>3</sup>

Nanopartículas metálicas tem despertado grande interesse na comunidade científica, devido a suas propriedades ópticas únicas e suas possíveis aplicações. Isso se deve principalmente porque, em escala nanométrica, nanoestruturas metálicas apresentam propriedades ópticas, eletrônicas, catalíticas, entre outras, muito diferentes das do material bulk. Essas mudanças nas propriedades ocorrem principalmente devido à grande proporção entre área superficial e o volume e também ao confinamento espacial dos elétrons livres.

Recentemente, tem-se despertado muito interesse em nanopartículas de morfologia anisotrópica, porque as propriedades desta morfologia são muito diferentes de nanopartículas esféricas. De todos os tipos de nanopartículas, os nanobastões de ouro têm despertado muita atenção, principalmente por que eles têm algumas características muito interessantes. Eles têm dois modos de ressonância de plasmons associados com as oscilações dos elétrons livres. O comprimento de onda de plasmon de modo longitudinal pode ser sinteticamente sintonizado em uma ampla faixa espectral, que vai do visível até a região do infravermelho, simplesmente variando sua razão de aspecto (Comprimento/largura). Eles têm pouca toxicidade em sistemas biológicos e sua química de superfície é simples, o que tem permitido a ligação de várias biomoléculas, e, além disto, tem sido demonstrado que são as melhores partículas para aplicação em SERS (73).

Muitos métodos de síntese têm sido relatados nos últimos anos na tentativa de obter nanobastões de ouro de alta qualidade, homogêneos e estáveis. O método chamado de “mediado por sementes”, descoberto por El-Sayed *et al* (2003) (74) e Murphy *et al* (2001) (75), tem sido o mais tradicional. Outro método para sintetizar nanobastões de ouro é o método fotoquímico que tem grande importância neste trabalho. Descrito pela primeira vez por Peidong Yang *et al* (76) em 2002, este método tem a vantagem de ser mais rápido e mais facilmente escalável para a produção em larga escala.

---

<sup>3</sup> Extraído da referência (126)

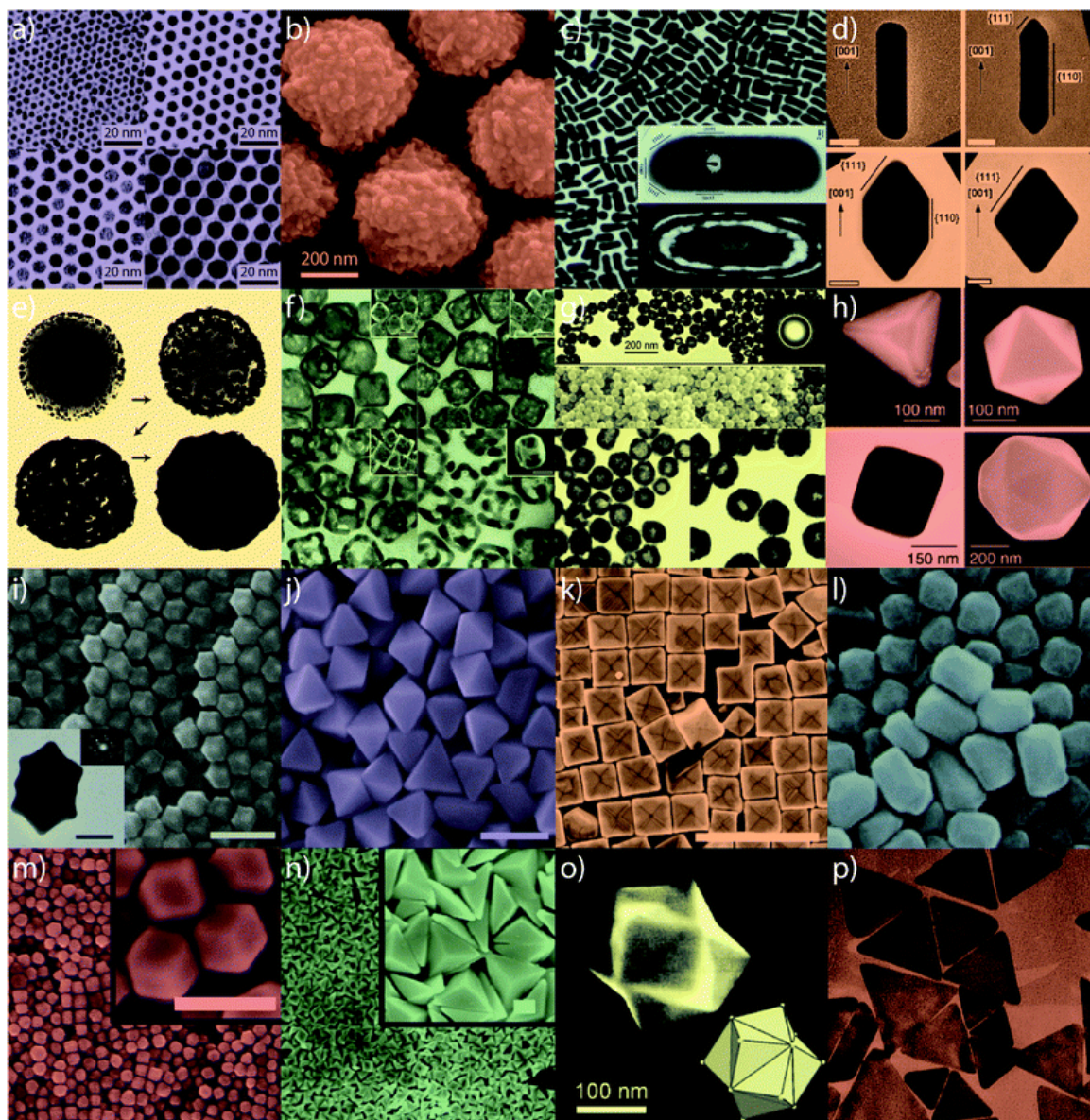


Figura 9 - Nanoestruturas de ouro de diversas morfologias. Pequenas Nanoesferas (a) Grandes Nanopartículas com superfície rugosa (b), Nanobastões (c) (d), Nanoshells (e), Nanogaiolas (f), Nanopartículas ocas (g), Tetraedros/octoedros/cubos/icosahedros (h), formato randômico (i), Pirâmides (j), Nanogaiolas Cubicas (k), nanobastões espessos (l), Cubos (m), diversas faces piramidais (n) (o), nano triângulos (p). (Modificado e reproduzido com permissão da referência (4))

### 1.6.5 - Propriedades plasmônicas de Nanobastões de Ouro

Os nanobastões de ouro têm propriedades plasmônicas muito interessantes que os diferem de nanopartículas com formato esférico (4) (77). A mais intrigante é a sua ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR). LSPR são modos eletromagnéticos associados com as oscilações coletivas dos elétrons livres confinados em nanoescala. Sobre uma excitação ressonante, eles têm a capacidade única de concentrar o campo elétrico dentro da região adjacente à superfície. Essa capacidade permite grande aumento da intensidade de campo elétrico em torno dos nanobastões. Quando excitados por uma radiação ressonante, três processos de decaimento acontecem nos nanobastões de ouro: geração de pares elétron-buraco, termonização e emissão de fótons. Além disso, eles ainda têm a capacidade de espalhar a luz incidente. Muitos estudos foram realizados para explicar os mecanismos de decaimento nos nanobastões de ouro (4). Na figura 10, temos um nanobastão de ouro sendo excitado com uma radiação de comprimento de onda próximo do infravermelho, e são mostrados os processos foto-físicos nele. Basicamente a radiação de energia na faixa do infravermelho induz uma excitação do modo de ressonância do plasmon longitudinal resultando em absorção e também em espalhamento. A absorção ocorre de duas formas, pela oscilação dos elétrons na direção longitudinal e na direção transversal. A grande vantagem dos nanobastões é a possibilidade de variar sua absorção óptica em função da sua razão de aspecto (Comprimento/largura). Essa variação de suas dimensões faz com que nanobastões de diferentes comprimentos, tenham diferentes propriedades ópticas (78). Uma transição eletrônica da banda -d para a banda-sp ocorre com absorção de dois fótons, gerando um par elétron-buraco cuja recombinação das cargas separadas resulta em uma emissão de luminescência de dois fótons (79) (80). Calor é gerado devido a colisões elétrons – fônons (81) (82) (83). Nos nanobastões de ouro, o comprimento de onda do plasmon longitudinal é altamente sensível ao meio dielétrico, o que vem sendo amplamente empregado para criação de biosensores (6) (84).

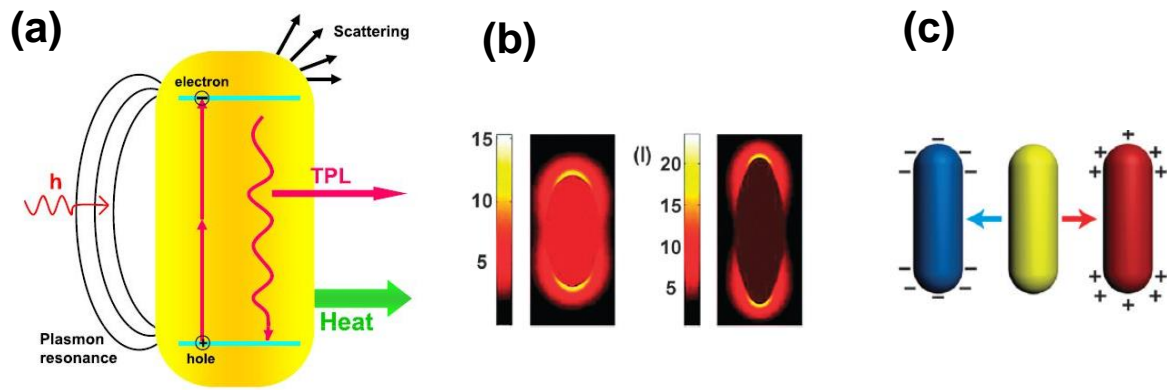


Figura 10 – (a) Propriedades dos nanobastões de ouro, quando excitados por uma radiação ressonante três processos de decaimento acontecem nos nanobastões de ouro, geração de pares elétron-buraco, termonização, e emissão de fótons. Além disto, parte da luz também é espalhada. (b) Forte campo elétrico criado em torno dos nanobastões na condição de ressonância, (c) Troca de carga nos nanobastões de ouro. (Modificado e reproduzindo com permissão das referências **(77) (4)**)

Através da teoria de Gans é possível demonstrar que o comprimento de onda do plasmon longitudinal nos nanobastões de ouro (4) é dado pela equação 35.

$$\lambda_{plasmon} = \lambda_p \sqrt{\epsilon_{\infty} + \left(\frac{1}{L} - 1\right)\epsilon_m} \quad (35)$$

$$\lambda_p = \sqrt{\frac{2\pi^2 c^2 m^* \epsilon_{\infty}}{N e^2}} \quad (36)$$

Onde  $\epsilon_{\infty}$  é a constante dielétrica do ouro e  $L$  é o fator de despolarização ao longo do eixo de comprimento do nanobastão, como detalhado nas equações 24 a 27. Na equação 36,  $c$  é a velocidade da luz,  $m^*$  é a massa efetiva dos elétrons no ouro,  $e$  é a carga elementar e  $N$  é a densidade de elétrons de condução. Nas equações fica claro que o comprimento de onda de ressonância do plasmon na direção longitudinal dos nanobastões de ouro depende da densidade de elétrons, do

meio dielétrico e da sua razão de aspecto. Outra situação interessante é a possibilidade de troca de carga superficial dos nanobastões de ouro (4).

Todas estas propriedades têm despertado a comunidade científica para importantes aplicações. A emissão de luminescência torna os nanobastões ótimos para bioimagens *in vivo* ou *in vitro* (85); a liberação de calor pode ser usada na terapia fototérmica de tumores (86); as dimensões nanométricas fazem deles ótimos para transporte de biomoléculas para o meio intracelular (87) e a propriedade de deslocamento do pico de plasmon longitudinal pela mudança do meio dielétrico em torno deles, como, por exemplo, uma ligação de compostos químicos em sua superfície, torna possível o desenvolvimento de biosensores multiplex (84).

#### 1.6.6 - Nanobastões em SERS

A propriedade mais importante dos nanobastões para aplicação em SERS é o forte campo elétrico criado em torno deles na condição de ressonância (Figura 10b). Nesta condição, os nanobastões se comportam como “nanoantenas” com enormes amplificações de campo. Muitos autores têm estudado esta questão e abordado que os nanobastões de ouro são excelentes para SERS devido à sua alta curvatura (73) (88). Zuloaga *et al* (89) estudaram este assunto, mostrando como o campo se distribui em torno dos nanobastões de ouro sendo mais intenso nas pontas, já que é uma região de alta curvatura. Na figura 10b, temos a intensidade do campo nas vizinhanças de um nanobastão em condição de ressonância, vemos que o campo é muito mais intenso em suas pontas. Nanobastões de ouro são melhores do que nanopartículas esféricas para aplicação em substratos SERS, isso se devendo principalmente ao fato de ter bandas de absorção de plasmons ajustáveis em toda a região visível e do infravermelho próximo (NIR), de ter uma superfície altamente curvada o que faz com que ele apresente um maior aumento do campo local, e também porque como demonstrado por Thomas *et al* (88), dimers de nanobastões de ouro formam regiões de altíssimo campo elétrico (hot-Spots). El-Sayed *et al* demonstraram que nanobastões de ouro tem maiores aumentos de sinal SERS do que nanopartículas esféricas (73), o que é devido à excitação parcial da banda de plasmon de superfície longitudinal e à contribuição do efeito químico entre a forte ligação das moléculas nas faces  $\{1\ 1\ 0\}$  dos nanobastões. Nanobastões podem

apresentar um aumento do campo elétrico muito maior em suas pontas em comparação com o aumento do campo em torno das nanopartículas, levando ao aumento da atividade SERS (90). Além disso, agregados de nanobastões também mostram fortes efeitos de intensificação SERS, maior de que agregados de nanopartículas, devido ao aumento da densidade dos pontos de junção resultante da sua grande área de superfície (91). Há interesse crescente pelo uso de nanobastões de ouro como substratos SERS em estudos químicos e biológicos nos últimos anos (37).

### 1.6.7 - Nanocompósitos

Nanoestruturas híbridas ou nanocompósitos são uma classe de materiais que são compostos de dois ou vários componentes, em que pelo menos um deles tem uma dimensão em nanoescala. Nanoestruturas híbridas têm as vantagens de seus componentes individuais, e ao mesmo tempo podem exibir novas propriedades e funções para aplicações práticas. Os componentes de uma estrutura híbrida podem ser escolhidos entre uma ampla gama de materiais, incluindo metais, óxidos metálicos, polímeros, materiais carbonáceos, etc. É importante notar que as suas morfologias são versáteis, tais como zero dimensionais (0D) como quantum dots, 1D como nanofios, 2D como as nanofolhas como, por exemplo, grafeno e derivados e 3D como estruturas porosas e redes (92).

A síntese controlada de nanoestruturas de metais sobre nanomateriais de carbono tem muito interesse, uma vez que as suas propriedades físicas e químicas são dependentes do seu tamanho, forma, composição e estrutura. Com as excelentes propriedades eletrônicas, grande área de superfície específica e boa estabilidade térmica e mecânica, o grafeno e os seus derivados são materiais ideais para a nucleação e crescimento dos nanocristais inorgânicos, para a produção de nanoestruturas híbridas funcionais através de diversos métodos. Vários trabalhos têm sido publicados onde nanoestruturas metálicas foram crescidas com sucesso sobre nanofolhas de grafeno, com o objetivo de atingir o melhor desempenho em aplicações como catálise, eletrônica e sensores (93) (94). O método de redução química *in situ* é a estratégia mais popular utilizada para a síntese de nanoestruturas híbridas grafeno-metal. A redução direta dos precursores metálicos (por exemplo,

H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>PdCl<sub>6</sub> ou CuCl<sub>2</sub>) na presença de óxido de grafeno (GO) ou de óxido de grafeno reduzido (rGO) usando como agente redutor NaBH<sub>4</sub> ou ácido ascórbico, é aplicada para a síntese de várias nanoestruturas com o grafeno. Por exemplo, nanopartículas de ouro (GNPs) foram sintetizadas no rGO por redução de AuCl<sub>4</sub> com NaBH<sub>4</sub> (95). Outros autores utilizaram métodos similares para formar híbridos entre nanobastões de ouro e óxido de grafeno (96) (97).

Características como ampla relação superfície/volume, alta dispersabilidade em água e em solventes orgânicos e uma vasta gama de grupos funcionais ligados à sua superfície, faz do GO um grande candidato para a formação de híbridos com nanoestruturas metálicas, como recentemente reportado por Shaojun Dong *et al* (2013) (93) e Perry T. Yin *et al* (2013) (94). Muitos nanocompósitos entre GO e nanoestruturas metálicas, tais como nanopartículas de ouro, prata, cobre e platina, para muitas aplicações importantes tem sido publicadas. A formação de nanocompósitos com nanobastões de ouro foi reportada nos últimos anos por vários autores, porém os métodos utilizados nestes trabalhos fazem uso de ligantes para promover a interação de GO com nanobastões de ouro.

Nanocompósitos entre óxido de grafeno e nanobastões de ouro são muito interessantes para substratos SERS. Neste trabalho foi desenvolvido um processo simples e fácil de formação de híbridos entre o óxido de grafeno e nanobastões de ouro *in situ*, por meio da síntese fotoquímica de nanobastões de ouro através da irradiação por luz ultravioleta e seu crescimento em regiões ativamente funcionalizadas de óxido de grafeno e de nanotubos de carbono funcionalizados. O nanocompósito resultante foi depositado como um filme fino, para o caso do GO, e como uma estrutura irregular por entrelaçamentos no caso dos nanotubos. Estes materiais foram aplicados no desenvolvimento de substratos para SERS, com elevada sensibilidade e uma excelente reprodutibilidade. A combinação do óxido de grafeno ou nanotubos de carbono, com nanobastões de ouro, forma um material que combina as propriedades químicas das nanoestruturas de carbono, com o enhancement eletromagnético dos nanobastões ouro.

# Objetivos

---

**Neste capítulo são apresentados os objetivos deste trabalho**

## 2 - OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é a síntese de nanobastões de ouro, e de nano compósitos entre nanobastões de ouro e nanoestruturas de carbono (nanotubos de carbono e óxido de grafeno), além de sua aplicação para o desenvolvimento de substratos SERS. Também é objetivo deste trabalho a utilização da dinâmica rotacional de nanobastões de ouro para detecção biológica através da técnica de espalhamento dinâmico de luz.

### 2.1 - Objetivos específicos

---

- Síntese e caracterização de nanobastões de ouro através do método de crescimento mediado por semente.
- Síntese e caracterização de nanobastões de ouro através do método de crescimento por irradiação de luz ultravioleta.
- Síntese e caracterização de nanocompósitos entre óxido de grafeno e nanobastões de ouro.
- Síntese e caracterização de nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro.
- Aplicação de nanobastões de ouro para estudo de efeito SERS
- Aplicação de nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro para o desenvolvimento de substratos SERS
- Aplicação de nanocompósitos entre óxido de grafeno e nanobastões de ouro para o desenvolvimento de substratos SERS.
- Medidas de “enhancement químico” em filmes de óxido de grafeno.
- Medidas da dependência do comprimento de onda do laser em medidas SERS.
- Detecção biológica através da técnica de espalhamento dinâmico de luz pela utilização da dinâmica rotacional de nanobastões de ouro.

# Parte Experimental

---

Síntese e caracterização dos Nanomateriais e Nanocompósitos

**Nas sessões 3.1 até 3.5 são apresentados os procedimentos e resultados de Síntese e caracterização dos Nanomateriais e Nanocompósitos.**

## 3 - PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental deste trabalho está dividida em três sessões. Primeiramente são apresentados os resultados de síntese e caracterização de nanobastões de ouro através de três diferentes métodos, o “mediado por semente”, o por irradiação UV, e o método utilizando compostos aromáticos como agentes redutores. Em seguida, são mostrados os resultados de síntese e caracterização dos nanocompósitos entre óxido de grafeno e nanobastões de ouro e também os resultados de síntese e caracterização dos nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro. Na sessão seguinte, são apresentados os resultados de estudo do efeito SERS em nanobastões de ouro puros, nos nanocompósitos entre GO e nanobastões de ouro, e nos nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro. Na sessão final, são mostrados os resultados de detecção biológica através da técnica de espalhamento dinâmico de luz pela utilização da dinâmica rotacional de nanobastões de ouro.

Os resultados desta primeira sessão foram patenteados no INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, sobre o número BR1020140122958 e publicados nas revistas científicas internacionais Journal of Colloid and Interface Science e RSC Advances.

**Síntese Fotoquímica de Nanoestruturas Híbridas de Ouro e Carbono e suas Aplicações e Usos. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140122958. CAIRES, Anderson. J. LADEIRA, L. O, ALVES, D. C. B, FERLAUTO, A. S. Raissa Vaz, Samary Spiria; Data de depósito: 21/05/2014, Instituição de registro: INPI: Instituto Nacional da Propriedade intelectual.**

**A. J. Caires, D. C. B. Alves, C. Fantini, A. S. Ferlauto, L. O. Ladeira. One pot in situ photochemical Synthesis of graphene oxide gold nanorod nanocomposite for Surface-enhanced Raman Spectroscopy. RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences - RSC Advances, 2015, 5, 46552 – 46557.**

A.J. Caires, R.P. Vaz, C. Fantini, L.O. Ladeira. Highly sensitive and simple SERS substrate based on photochemically generated carbon nanotubes-gold nanorods hybrids. *Journal of Colloid and Interface Science* 455 (2015) 78–82.

### 3.1 - Materiais

---

Ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) foi sintetizado no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG, utilizando um procedimento previamente descrito na literatura (98). Brevemente, 5 g de ouro puro foram dissolvidos em 80 mL de água régia ( $\text{HCl}:\text{HNO}_3$  3:1 v/v). Após o ouro ser completamente dissolvido pela mistura de ácidos, a solução foi colocada em estufa a 60 °C para a evaporação da mistura de ácidos. Em seguida foi então adicionado ácido nítrico e repetido a secagem por três vezes. Ao final o precipitado foi pesado e disperso em água deionizada na concentração ideal de 0,1 M de  $\text{HAuCl}_4$ .

Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB – Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), acetona, ácido bromo salicílico e ciclohexano foram adquiridos na Sigma Aldrich. Pó de grafite foi fornecido pela Nacional de Grafite (HC 30, pureza  $\geq 99,5$ , partículas de diâmetro médio de 27,5 mM).  $\text{NaNO}_3$  (Merck, 99% de pureza),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95,0-98,0%),  $\text{KMnO}_4$  (Sigma Aldrich, pureza  $\geq 99\%$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  e heptóxido de dimanganês ( $\text{Mn}_2\text{O}_7$ ) foram adquiridos de fornecedores comerciais. Todos os solventes foram obtidos a partir de fornecedores comerciais sem purificação adicional. Foi utilizada água Milli-Q com uma resistividade de 18,2 mohms  $\cdot$  cm. GO foi sintetizado utilizando o método de Hummers. O reator foi construído no próprio laboratório utilizando lâmpadas de ultravioleta comerciais e um tubo de quartzo de 1 m de comprimento por 1 cm de largura. Foi utilizada a centrífuga ThermoScientific™ Sorval LegenMach 1,6.

## 3.2 - Técnicas de caracterização

---

A caracterização óptica foi realizada por espectroscopia UV-Vis-Nir, com um espectrofotômetro Shimadzu 3600, utilizando cubetas de quartzo de caminho óptico de 10 milímetros de comprimento. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-20, instalado no Centro de Microscopia da UFMG, usando grades de cobre com um filme contínuo de carbono padrão para microscopia, e uma tensão de aceleração de 200 kV. A imagem de TEM de campo escuro foi realizada no microscópio de transmissão TITAN, instalado no INMETRO. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura quanta 200, instalado no Centro de Microscopia da UFMG e no Microscópio Eletrônico de Varredura - JEOL JSM - 6360LV. As amostras foram preparadas a partir da dispersão sobre uma grade TEM (200 malhas de carbono) de uma gota de solução. Medidas de SERS e Raman foram realizadas utilizando um espectrômetro Dilor XY com um laser de Ar com comprimento de onda de excitação de 647 nm com uma objetiva 10X, e no espectrômetro T64000, usando lasers na região do infravermelho. A potência do laser sobre a amostra foi mantida a 1 mW, os espectros foram adquiridos durante 10 segundos com uma acumulação. O mapeamento SERS foi realizado em um Raman Microscope alpha 300 R (Witec), com comprimento de onda de excitação 633 nm e acúmulo 0,3 segundo. A potência do laser sobre a amostra foi mantida abaixo de 1 mW focalizada por meio de um microscópio com objetiva de 100X. A caracterização térmica dos nanotubos de carbono foi realizada em um equipamento Shimadzu DTG60/60H, com razão de aquecimento de 10 °C/min entre 25 °C - 800 °C em fluxo de 100 mL/min de ar sintético ultra seco. A massa de amostra empregada nas análises foi em torno de 2 – 3 mg. As medidas de dispersão dinâmica de luz despolarizada e polarizada foram realizadas utilizando um banho térmico a 30 °C para manter a solubilidade do CTAB. O aparelho utilizado foi um dispositivo de correlação de fótons Brookhaven BI9000 operando na configuração 90 graus de geometria de espalhamento, com laser de comprimento de onda de 633 nm.

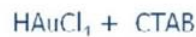
### 3.3 - Síntese de nanobastões de ouro

---

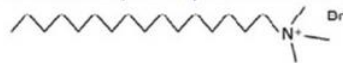
#### 3.3.1 - Síntese de nanobastões de ouro – Método mediado por semente

O método mais comum para sintetizar nanobastões de ouro é o método chamado de crescimento “mediado por sementes”, desenvolvido por El-Sayed *et al* (2003) (74) e Murphy *et al* (2001) (75). Neste processo de crescimento, nanopartículas de ouro de diâmetro de cerca de ~3 nm são preparadas separadamente, geralmente por redução de uma solução de CTAB e ácido cloroáurico em meio aquoso com boro hidreto de sódio. Estas nanopartículas são chamadas de “sementes”. Certa quantidade desta solução semente é adicionada em outra solução, chamada de solução de crescimento, que é uma solução aquosa de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> em CTAB. Na solução de crescimento, os íons de ouro Au (III) são reduzidos para Au (I) pela adição de um agente redutor fraco, geralmente ácido ascórbico. A solução semente é adicionada à solução de crescimento, onde as nanopartículas de ouro (sementes) atuam catalisando a redução dos íons de ouro Au (I) para Au (0) de maneira a permitir a formação de nanopartículas de ouro. Porém, o CTAB tem preferência de ligação em planos específicos do ouro e assim, o crescimento resulta em partículas de formato anisotrópico. Por outro lado, íons prata se ligam seletivamente às faces de maior energia {110} dos nanocristais de ouro em formação, de forma a desacelerar a taxa de crescimento sobre estas faces. Como resultado, os átomos de ouro serão predominantemente depositados sobre as faces {100}, o que conduz ao crescimento longitudinal dos nanobastões. A variação da concentração de íons prata é um dos mecanismos utilizados para variar o tamanho dos nanobastões formados. Adicionalmente, o tamanho e a forma dos nanobastões podem ser modificados ajustando cuidadosamente as condições de crescimento, tais como a composição do surfactante, o pH da solução de crescimento, as quantidades dos reagentes, a temperatura de crescimento, e a estrutura das sementes. Este método de síntese é o que resulta em melhores resultados para os nanobastões de ouro, no que diz respeito à homogeneidade, qualidade, controle de tamanho e reprodutibilidade. Na figura 11, temos o esquema deste processo químico de formação dos nanobastões de ouro (99).

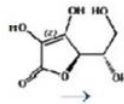
### Solução de Crescimento



CTAB : Hexadecyltrimethylammonium bromide



### Redução da Solução de Crescimento



### Adição da solução semente



Figura 11 - Síntese de nanobastões de ouro – Método mediado por semente. Processo de síntese (Modificado e reproduzido com permissão da referência (99))

#### 3.3.1.1 - Solução semente

A solução semente foi preparada adicionando-se 300  $\mu\text{L}$  de 0,1 M de uma solução aquosa de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), em 250 mL de uma solução aquosa (0,1 M) de CTAB. A solução resultante é então aquecida sob agitação magnética por 15 minutos, e logo após é adicionada 1 mL de boro hidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). A cor muda rapidamente de dourada para marrom, evidenciando a redução do ouro e a formação de nanopartículas de ouro. A solução é então deixada em banho térmico em uma temperatura de 30  $^\circ\text{C}$  por uma hora.

#### 3.3.1.2 - Solução de crescimento

A solução de crescimento foi preparada adicionando-se 3 mL (0,1 M) de uma solução aquosa de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), em 250 mL (0,1 M) de uma solução aquosa de CTAB; logo após são adicionadas 100  $\mu\text{L}$  (0,1 M) de ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), e 1 mL (0,47 mM) de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ). A solução fica então transparente e são adicionados valores variáveis da solução semente (20 a 100  $\mu\text{L}$ ). Diferentes quantidades de solução semente resultarão em nanobastões com diferentes comprimentos. Essa solução fica então em banho térmico por 24 horas (30 $^\circ\text{C}$ ).

Na figura 12 temos o resultado da síntese dos nanobastões de ouro. Vemos que temos soluções coloidais de cores diferentes, que caracterizam diferentes razões de aspecto (comprimento/largura). Estas amostras já estão devidamente purificadas e em água deionizada.

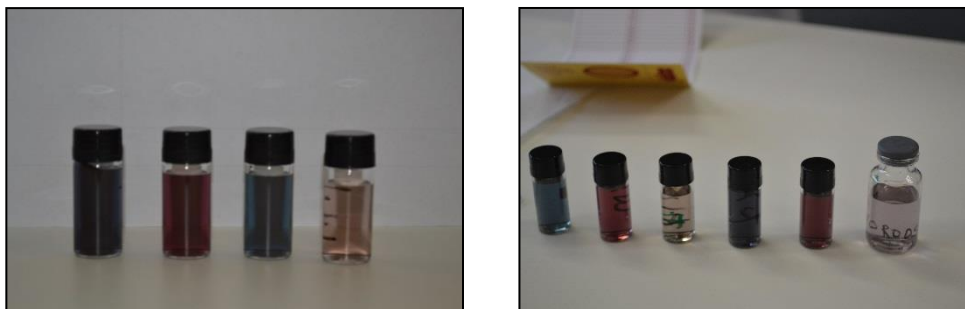


Figura 12 – fotografias mostrando diferentes soluções coloidais de nanobastões de ouro.

### 3.3.1.3 - Purificação

Após a síntese os nanobastões ficam dispersos em meio aquoso na presença do CTAB, porém é necessária a retirada do CTAB e a dispersão dos nanobastões em água deionizada. É preciso ainda a retirada de nanopartículas de outros formatos gerados durante o processo de crescimento, sendo este trabalho realizado através de repetidas centrifugações. O mesmo método de purificação foi utilizado para todas as sínteses dos nanobastões de ouro. Na figura 13 temos o resultado deste processo, na letra (a) temos os nanobastões antes, na letra (b) as impurezas removidas da solução, e em (c) os nanobastões purificados.

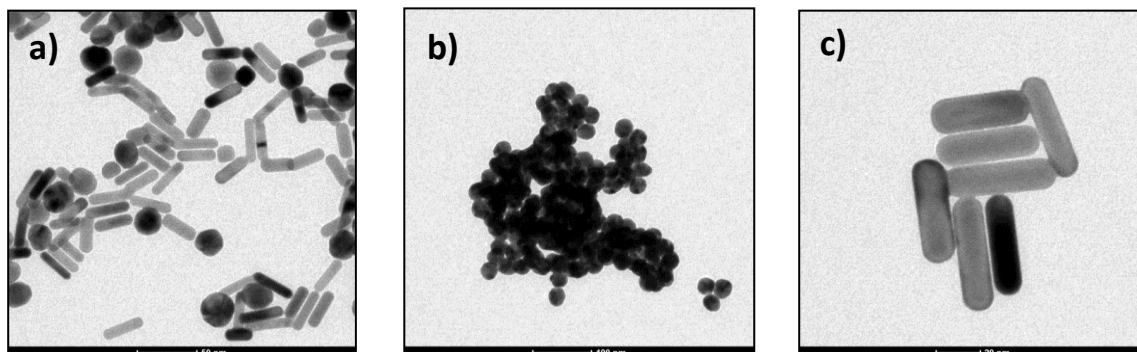


Figura 13 - a) Nanobastões de ouro antes da purificação b) impurezas removidas c) nanobastões após a purificação.

### 3.3.1.4 - Caracterização

Os nanobastões foram caracterizados com medidas de espectroscopia UV-Vis-NIR no Laboratório de óptica do departamento de Física UFMG, por imagens de microscopia eletrônica de transmissão no Centro de Microscopia da UFMG e por imagens de microscopia de força atômica no Laboratório de Nanoscopia da UFMG. Na figura 14 temos medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras diferentes de nanobastões, mostrando a variação do pico de absorção longitudinal. Na figura 15 temos imagens de microscopia dos nanobastões sintetizados.

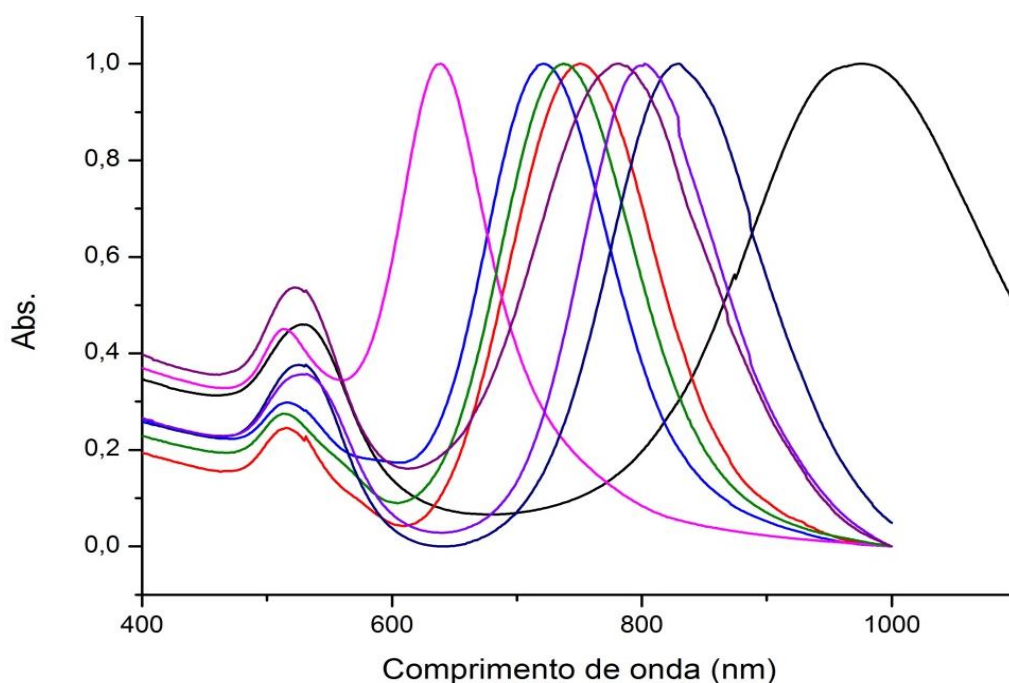


Figura 14 - Espectros de absorção óptica de nanobastões de ouro sintetizados pelo método mediado por semente com diferentes razões de aspecto.

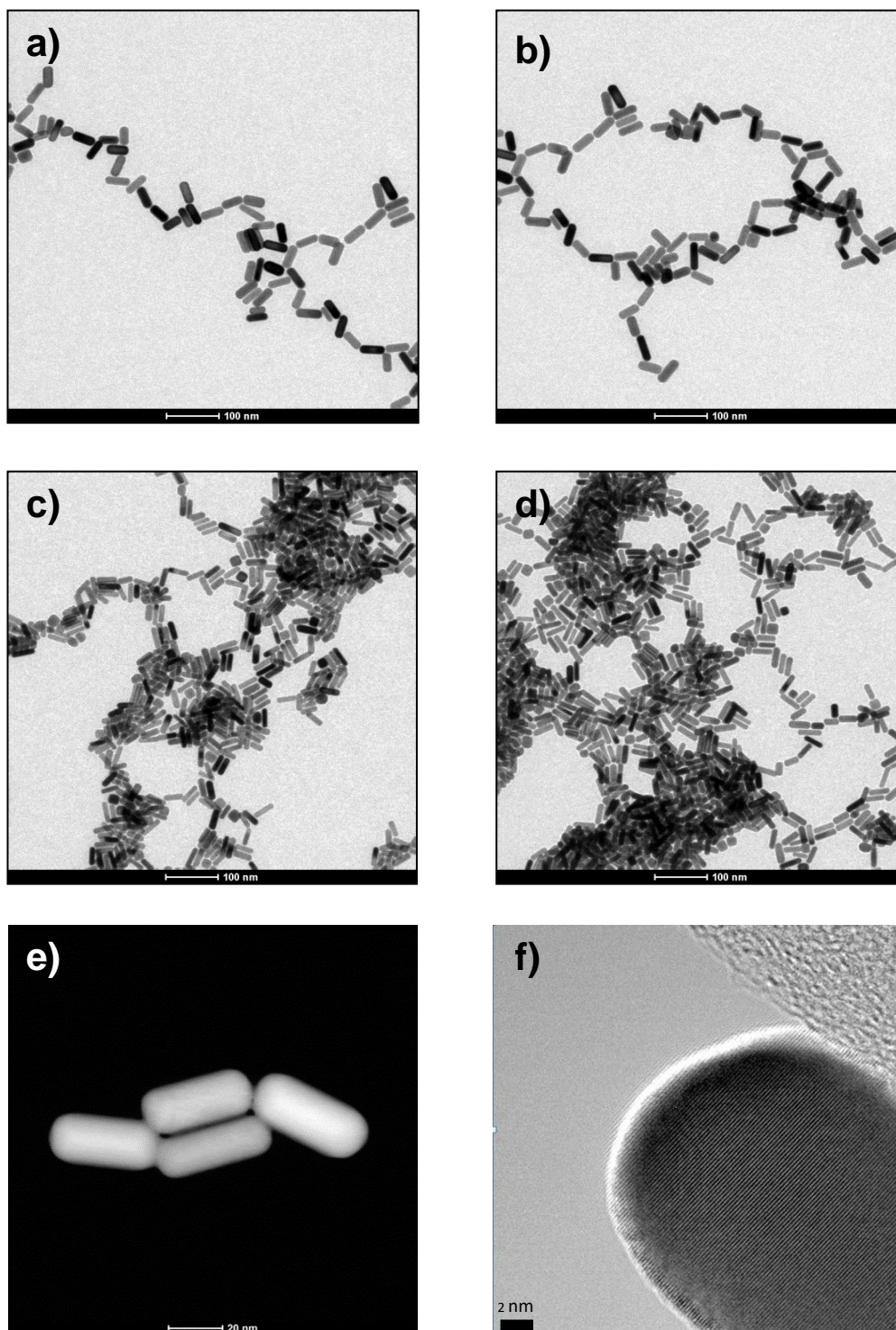


Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanobastões de ouro, a-d) Imagens de vários pontos da mesma amostra de nanobastões, mostrando a homogeneidade da síntese por semente, e) Imagem de campo escuro de nanobastões de ouro, f) Imagem de alta resolução.

Na figura 16 temos imagens de microscopia de um grupo de nanobastões e sua imagem de difração de elétrons, e também de um nanobastão isolado e sua imagem de difração de elétrons. Estes resultados mostram o caráter cristalino dos nanobastões de ouro.

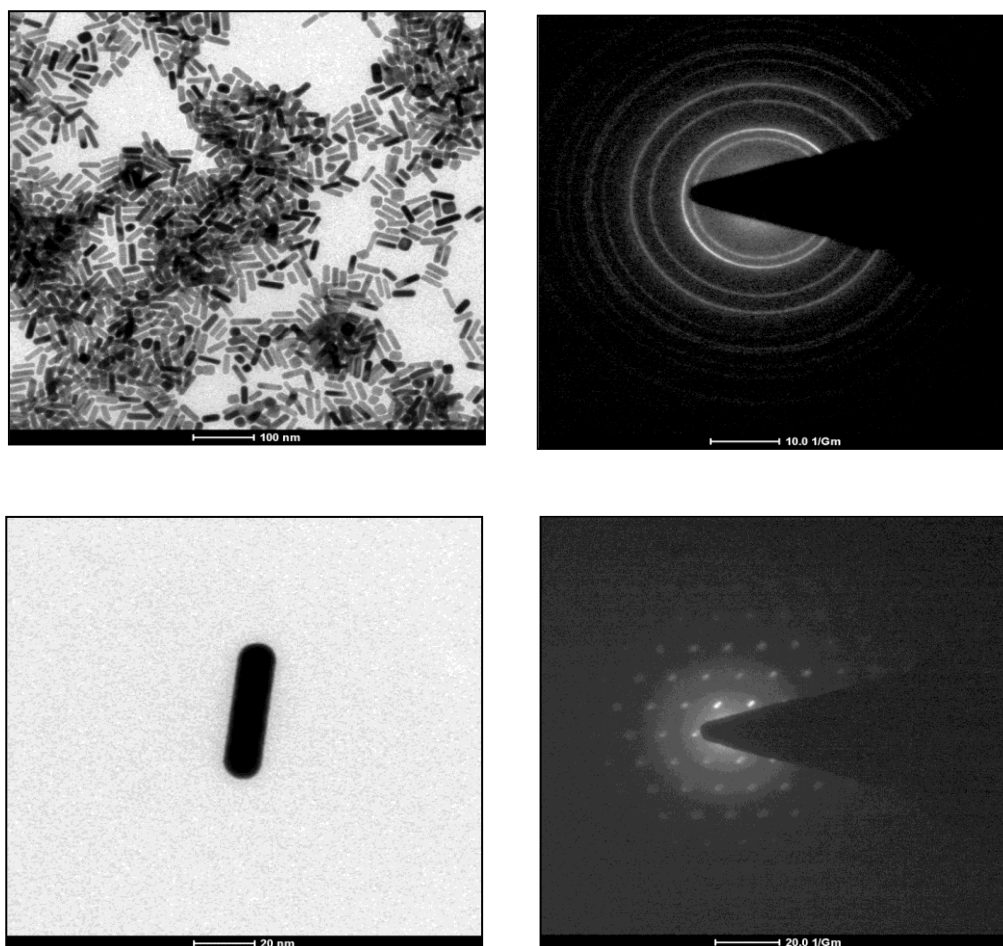


Figura 16 - imagens de microscopia eletrônica de transmissão de um grupo de nanobastões e sua imagem de difração de elétrons e de um nanobastão isolado e sua imagem de difração de elétrons.

Na figura 17 temos uma imagem de microscopia de força atômica de um nanobastão de ouro e as medidas de suas dimensões. Na figura 18 temos uma imagem de microscopia de força atômica de um grupo de nanobastões de ouro.

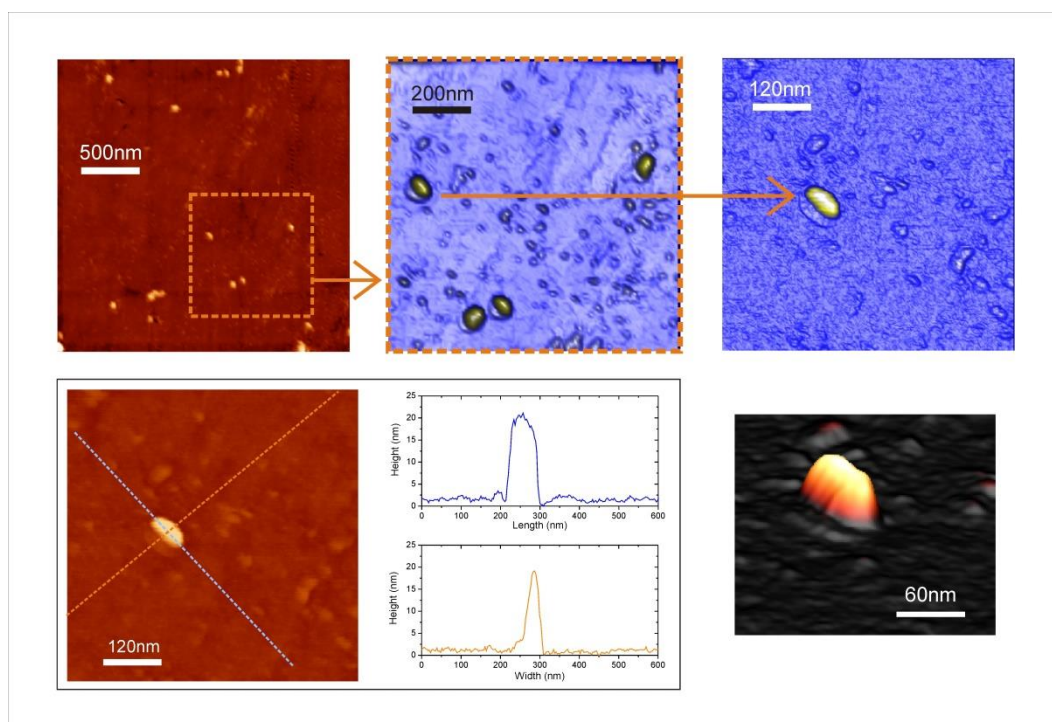


Figura 17 - Imagem de AFM de um nanobastão de ouro.

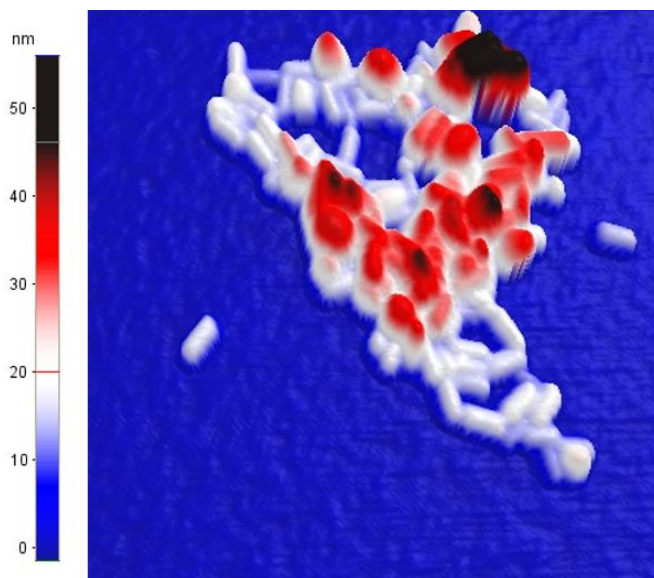


Figura 18 - Imagem de AFM de um grupo de nanobastões de ouro.

### 3.3.6 - Síntese de nanobastões de ouro – Método de irradiação por luz UV

Para a síntese de nanobastões de ouro pelo método de irradiação por luz ultravioleta, foi utilizada uma montagem de reator que ilumina de maneira uniforme a solução contida em um tubo de quartzo, (figura 19). Primeiro foi preparada uma solução aquosa de 20 mL (0,1 M) de CTAB e, em seguida, adicionou-se 100 µl (0,1 M) de H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>. A solução foi agitada durante 15 minutos. Em seguida, foi adicionado em sequência 1 mL (1 mM) de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), 400 µL de ciclohexano, 330 µL de acetona e 100 µL (0,1 M) de ácido ascórbico (C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub>). Logo em seguida, a solução mudou de amarelo para transparente. A solução foi então colocada sob irradiação UV durante 25 minutos. Após este processo, uma solução aquosa de nanobastões de ouro em CTAB é obtida. Terminada a reação, o CTAB em excesso foi removido da solução por meio de três ciclos de centrifugação (5600g, durante 10 min) e os nanobastões de ouro foram dispersos em água deionizada 18,2 mohms. Neste processo de síntese, as reações fotoquímicas promovem o crescimento de nanobastões de ouro, sendo que o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) atua como surfactante, direcionando o crescimento para morfologia anisotrópica. O ácido cloroáurico (H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>) é o precursor de ouro e o nitrato de prata atua na indução do crescimento conforme já comentado anteriormente. O ácido ascórbico atua na primeira redução do precursor de ouro de Au (III) para Au (I). O ciclohexano promove a formação de micelas que auxiliam o crescimento anisotrópico e a acetona é o iniciador radicalar, que gera radicais cetil capazes de promover uma redução de Au (I) em Au (0), dando assim início ao crescimento dos nanobastões de ouro.

Na figura 20 temos o espectro de absorção óptica dos nanobastões de ouro sintetizados via irradiação por luz ultravioleta. Por este espectro, vemos a boa qualidade da síntese. Porém nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (figura 21), fica claro que a qualidade dos nanobastões formadas é inferior aos produzidos pelo método de síntese “mediada por sementes”, figura 15. Este método, porém, tem a grande vantagem de ser mais fácil e rápido, além de proporcionar uma maior quantidade de nanobastões sintetizados em uma única etapa.

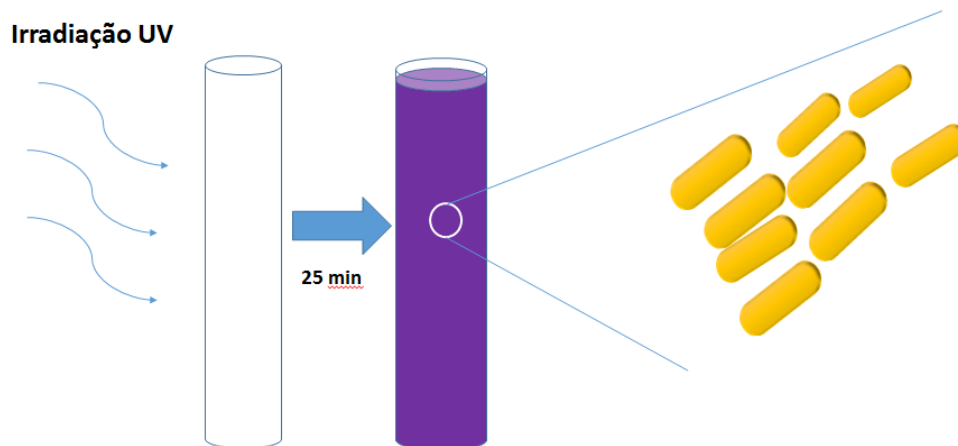


Figura 19 - Processo de síntese de nanobastões de ouro por irradiação de luz ultravioleta.

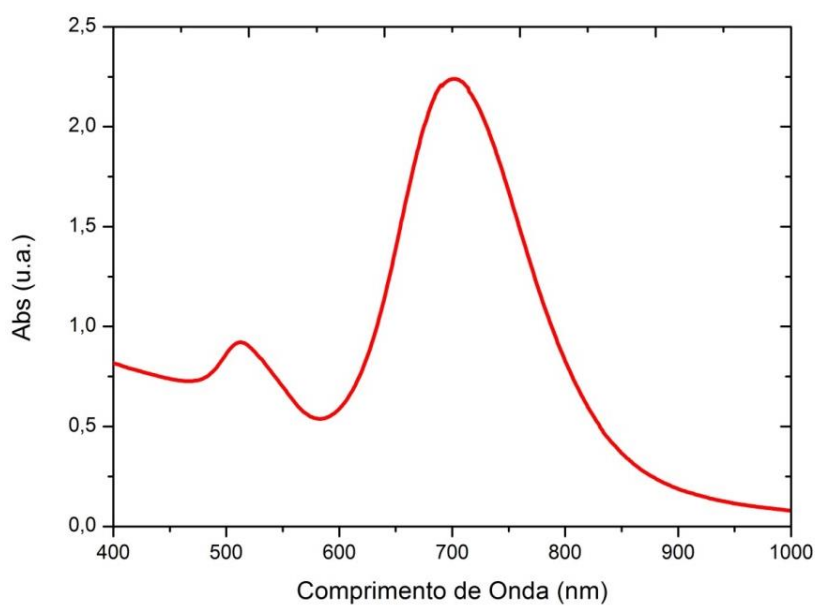


Figura 20 - Espectro UV-Vis-NIR de nanobastões sintetizados por irradiação UV.

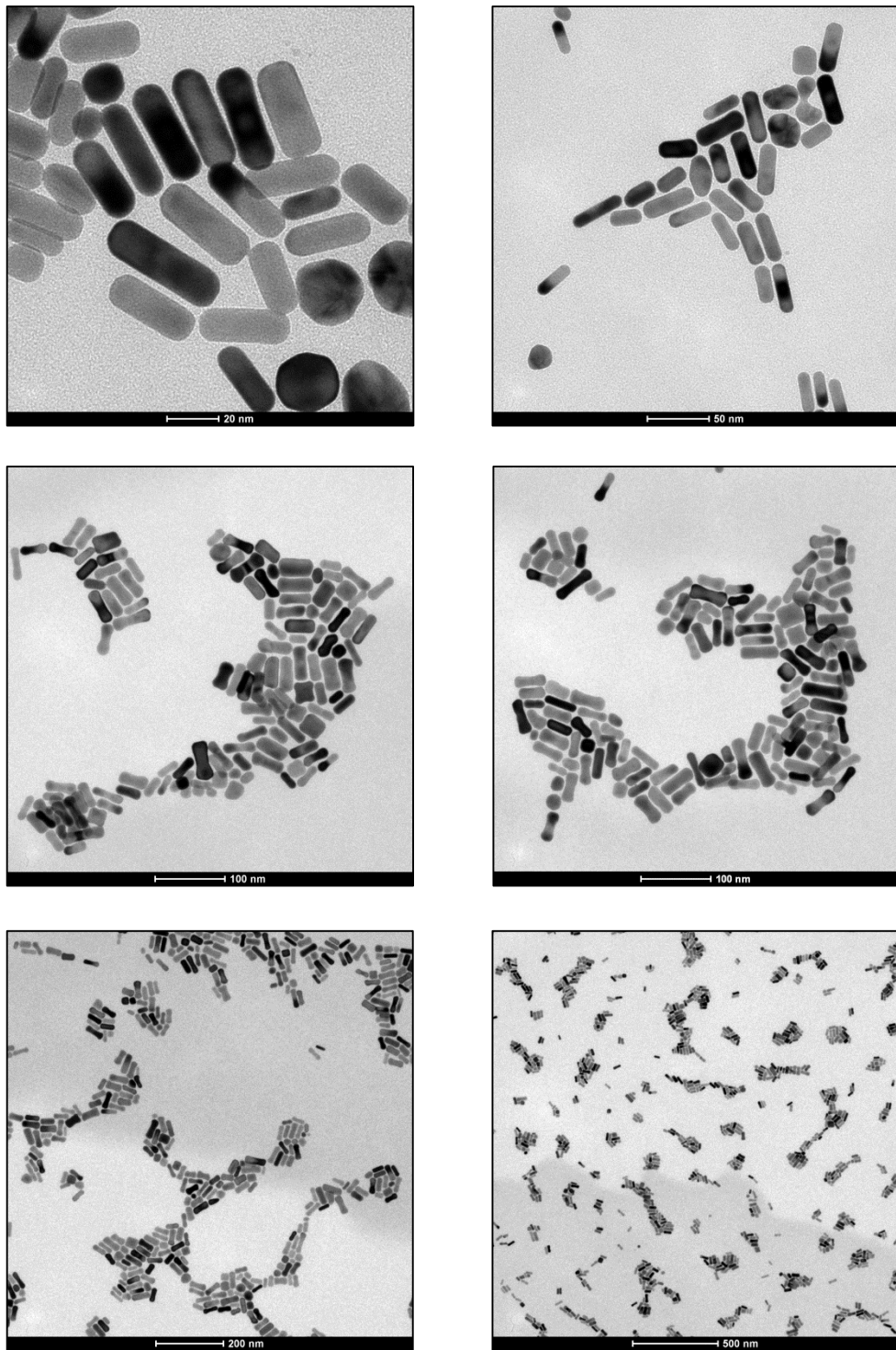


Figura 21 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanobastões de ouro sintetizados pelo método de irradiação por UV.

### 3.3.7 - Síntese de nanobastões de ouro – Método mediado por semente por adição de compostos aromáticos.

Diversas metodologias de síntese de nanobastões de ouro têm sido descritas na literatura desde o trabalho original de El-Sayed *et al* (2003) (74) e Murphy *et al* (2001) (75). Vários autores têm tentando melhorar a síntese dos nanobastões para aplicações diversas. Recentemente, Murray *et al* (100) publicaram a síntese de nanobastões de ouro através do método de semente, porém com a adição de aditivos aromáticos. Neste trabalho, foi realizada a síntese dos nanobastões de ouro como proposto por Murray e colaboradores.

A solução semente foi preparada da mesma forma que a preparada para síntese de nanobastões pelo método de semente tradicional, como descrito na sessão 3.3.1.1. Primeiramente, 5 mL de  $\text{HAuCl}_4$  (0,5 mM) foram misturadas com 5 mL (0,2 M) de solução de CTAB. Um volume de 1,6 mL (1 mM) de  $\text{NaBH}_4$  foi adicionada na solução de  $\text{HAuCl}_4$ -CTAB sob agitação (1200 rpm). A cor da solução mudou de amarelo para alaranjado, e a agitação foi interrompida após 2 min. A solução de semente foi envelhecida à temperatura ambiente durante 30 min antes da utilização.

Para preparar a solução de crescimento, 9,0 g de CTAB, juntamente com 1,1 g de ácido bromo salicílico foram dissolvidos em 250 mL de água quente (55 °C) em um erlenmeyer de 500 mL. A solução foi deixada resfriar naturalmente até 30 °C, quando foi adicionada 12 mL de uma solução 4 mM de  $\text{AgNO}_3$ . A mistura foi mantida em repouso a 30 °C durante 15 min. Em seguida, 250 mL (1 mM) de uma solução de  $\text{HAuCl}_4$  foi adicionada sob agitação. Após 15 min de agitação (400 rpm), 2 mL de 0,064 M de ácido ascórbico foi adicionado, e a solução foi agitada vigorosamente durante 30 segundos até se tornar incolor. Finalmente, 0,8 mL de solução semente foi adicionada na solução em crescimento. A mistura resultante foi agitada durante 30 s e deixada em repouso a 30 °C durante 12 h para o crescimento dos nanobastões de ouro. A solução resultante foi purificada pelo mesmo processo usando anteriormente.

Na figura 22 temos o espectro de absorção óptica dos nanobastões de ouro sintetizados pelo método de semente com adição de compostos aromáticos. Este

espectro mostra a boa qualidade da síntese, pelo fato do pico corresponde à absorção ressonante devido à oscilação longitudinal ser maior que o pico devido à oscilação transversal. Isso é confirmado pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 23).

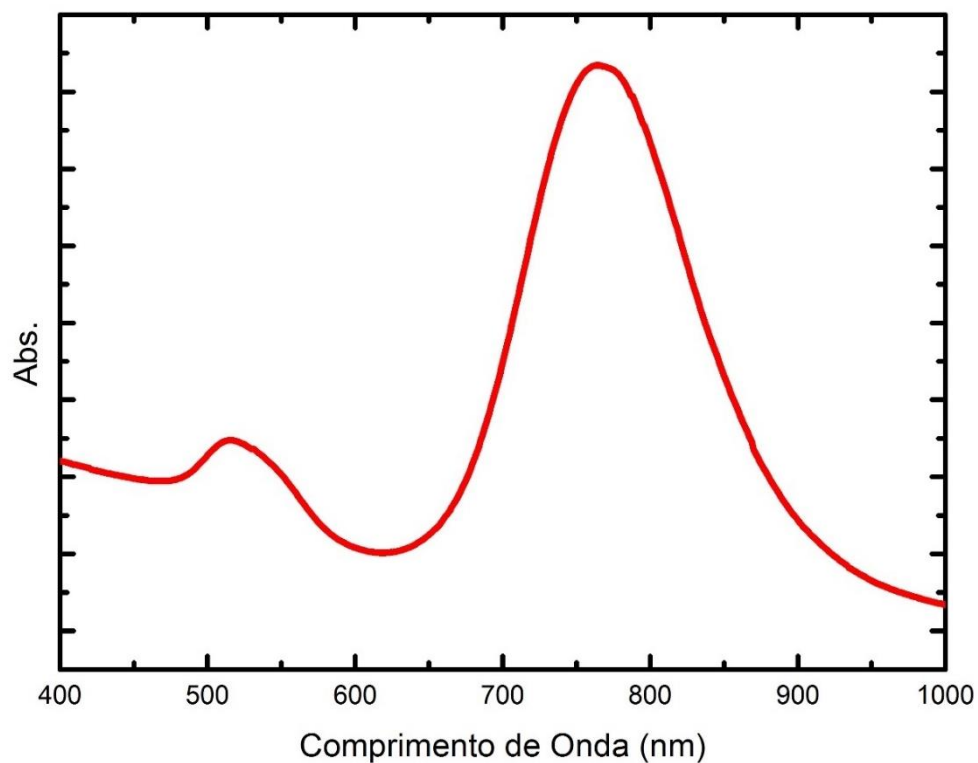


Figura 22 - Espectro UV-Vis-NIR de nanobastões sintetizados pelo método de semente com adição de compostos aromáticos

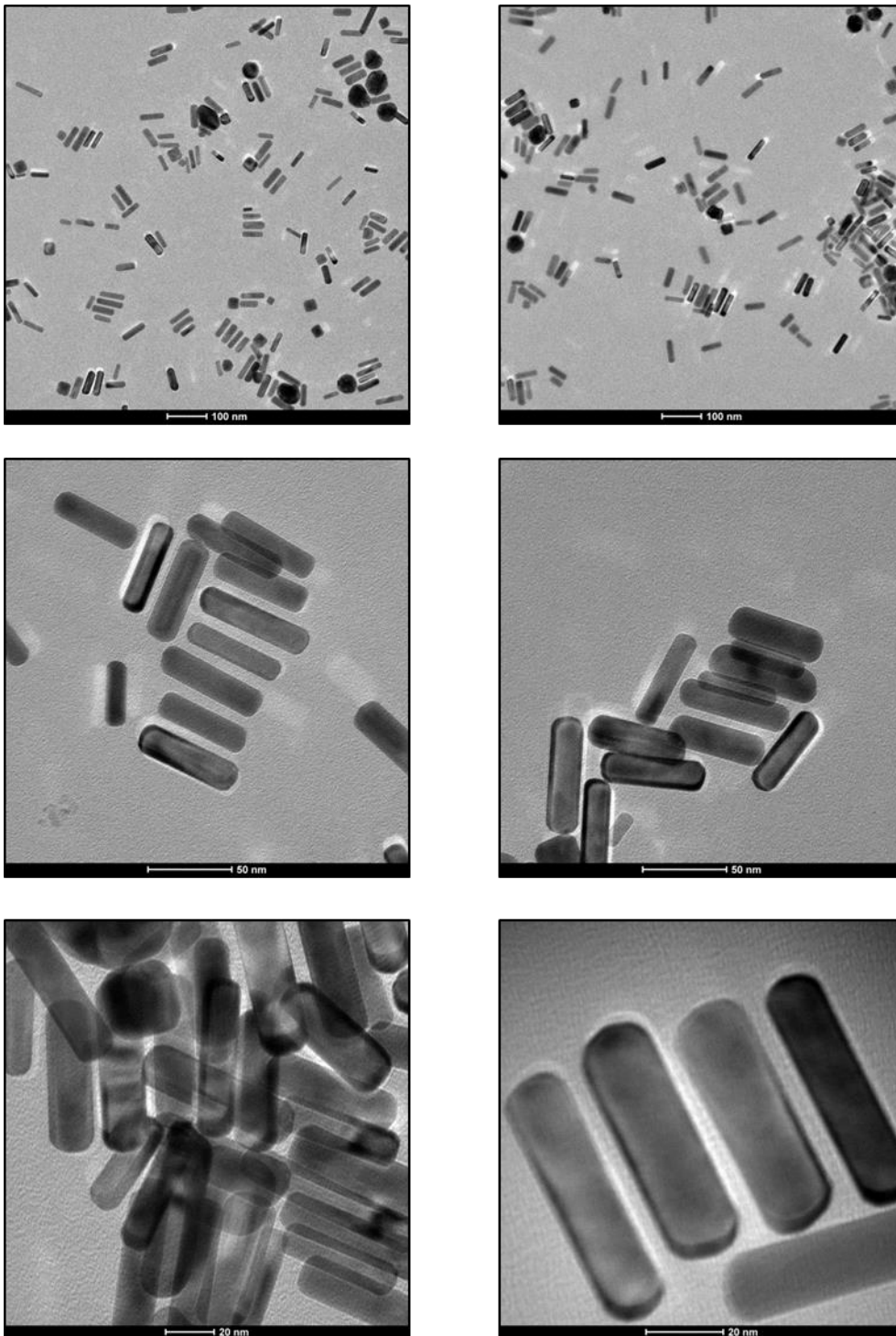


Figura 23 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanobastões de ouro sintetizados pelo método de sementes com adição de compostos aromáticos.

Como foi demonstrado nas sessões anteriores foram empregados três diferentes métodos para a síntese dos nanobastões de ouro, todos com excelentes resultados. Pelas imagens de microscopia o método mediado por semente tradicional foi o que apresentou os melhores resultados pela qualidade e homogeneidade da síntese. Por outro lado, a método por irradiação por luz ultravioleta é mais rápido e pode ser aplicado à síntese em maior escala. Nas próximas sessões, estão apresentados os resultados para síntese e caracterização de nanocompósitos entre materiais de carbono e nanobastões de ouro.

### **3.4 - Síntese de nanocompósitos entre óxido de grafeno e Nanobastões de Ouro**

---

#### **3.4.1 - Síntese do óxido de grafeno (GO)**

O óxido de grafeno foi sintetizado utilizando o bem conhecido método de Hummers modificado (71) (101). Inicialmente, foram adicionados 10 g de pó de grafite (fornecido pelo National grafite, HC 30, pureza  $\geq 99.5$  % em massa, diâmetro médio das partículas de 27,5  $\mu\text{m}$ ) e 7,5 g de  $\text{NaNO}_3$  (Merck, 99% em massa de pureza) em um Béquer contendo 338 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (teor de sintetizador de 95,0-98,0%). Esta solução foi agitada num banho térmico a 0 °C até à obtenção de uma mistura homogênea. Em seguida, foram adicionados 45 g de  $\text{KMnO}_4$  (Sigma Aldrich, pureza  $\geq 99$ % em massa) de forma gradual. Uma vez que em contato com o ácido sulfúrico concentrado, o permanganato de potássio é submetido a uma reação exotérmica formando heptóxido de manganês ( $\text{Mn}_2\text{O}_7$ ). Este reagente é um oxidante extremamente forte, capaz de explodir quando aquecido a temperaturas acima de 55 °C ou quando em contato com compostos orgânicos. Neste caso, a adição de permanganato foi realizada de um modo cuidadoso para controlar a temperatura de modo que a mesma não excedesse 15 °C. Depois de duas horas, a solução foi removida do banho a 0 °C e mantida sob agitação suave, sob temperatura de 26 °C, durante 4 dias. Após este período, a solução, que tinha uma cor preto esverdeado, transformou-se em uma pasta extremamente viscosa de cor marrom escura. A esta suspensão adicionou-se gradualmente 1L de uma solução aquosa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5% p/p, e a temperatura foi mantida abaixo de 80 °C. Depois de 2 horas foram

adicionados sob agitação, 30 g de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (solução aquosa a 30% p/p) e a mistura resultante foi agitada durante 2 h.

### 3.4.2 - Caracterização do óxido de grafeno

A morfologia das amostras de óxido de grafeno foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM TECNAI G2-20, usando uma tensão de aceleração de 200 kV no centro de microscopia da UFMG) e por microscopia de força atômica (AFM, Seiko Instruments Inc., SPA-300 HV). Espectroscopia UV-VIS (UV-VIS. Hitachi inc, U-3900) foi utilizada para medir as propriedades de absorção óptica de GO. Espectroscopia Raman foi realizada para caracterização vibracional.

Na figura 24, temos imagens de microscopia eletrônica de transmissão de folhas do óxido de grafeno, podemos ver as folhas em regiões de buraco da grade utilizada para a microscopia.

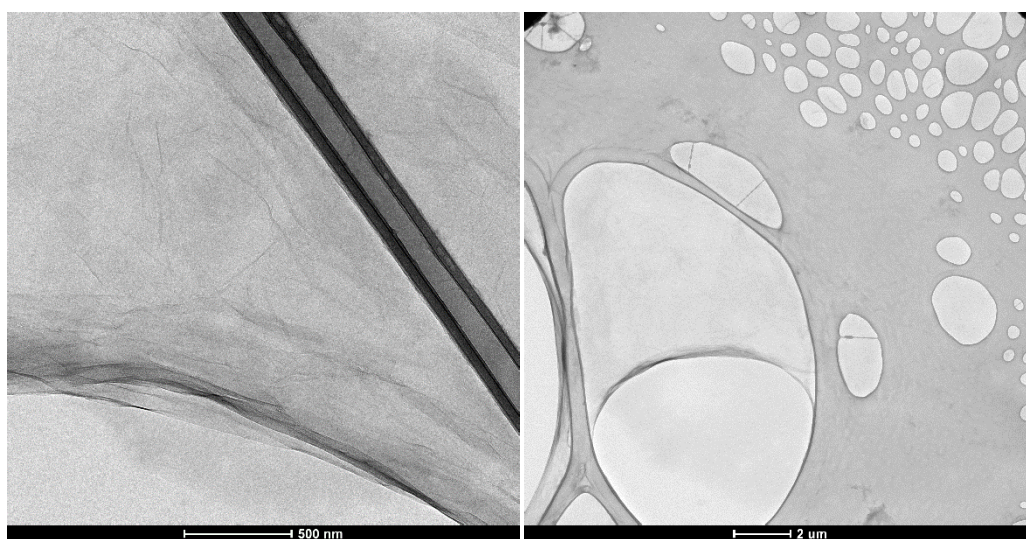


Figura 24 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de folhas de óxido de grafeno.

Na figura 25 (a) temos o espectro de absorção óptica da solução de óxido de grafeno, que mostra forte absorção óptica na região do ultravioleta (102). Na figura 25 b) temos o espectro Raman do GO em que a banda D (associada com a ordem/desordem do sistema) e a banda G, são os modos de vibração dominantes observado em estruturas de grafite. Na figura 26, temos imagens de microscopia de força atômica de folhas de GO.

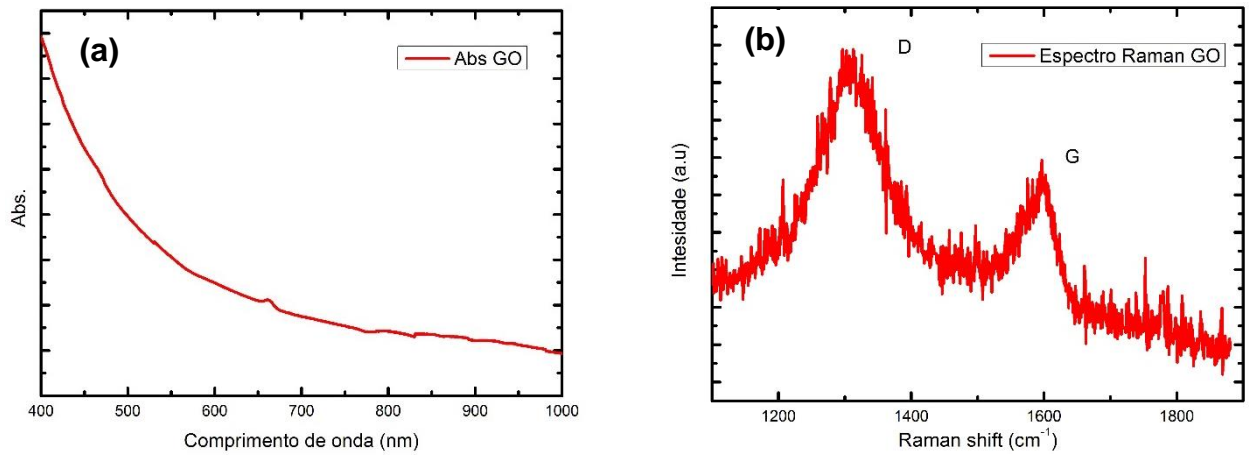


Figura 25 - a) Absorção óptica de solução de óxido de grafeno, b) espectro Raman do óxido de grafeno.

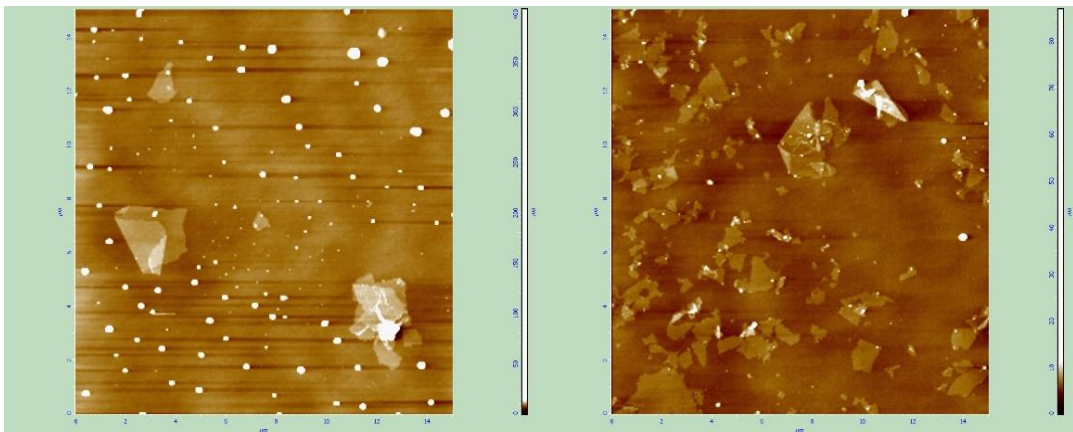


Figura 26 - Imagens de microscopia de força atômica de folhas de GO.

### 3.4.3 - Síntese de nanocompósitos entre óxido de grafeno e Nanobastões de ouro

Para a síntese dos nanocompósitos formados por óxido de grafeno e nanobastões de ouro, primeiro foi preparada uma solução de 15 mL (0,1 M) de CTAB e, em seguida, adicionou-se 100 µL de 0,1 M de H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>. A solução foi agitada durante 15 minutos. Em seguida, foi adicionado, em sequência, 1 mL (1mM) de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), 400 µL ciclohexano, 330 µL de acetona e 100 µL (0.5M) de ácido ascórbico (C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub>). Logo em seguida, a solução mudou de amarelo para transparente. Finalmente adicionou-se 5 mL de 0,01 M de GO. A solução foi então colocada sob irradiação UV durante 25 minutos (Figura 27). Após este processo, a solução de nanocompósitos formada por óxido de grafeno e nanobastões de ouro em CTAB é obtida. Terminada a reação, o CTAB em excesso foi removido da solução, por meio de três ciclos de centrifugação (5600g durante 10 min), e os nanobastões de ouro foram dispersos em água deionizada 18,2 mohms. Neste processo de síntese, as reações fotoquímicas promovem o crescimento de nanobastões de ouro, sendo que o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) atua como surfactante, direcionando o crescimento para morfologia anisotrópica, o ácido cloroáurico (H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>) é o precursor de ouro, o nitrato de prata atua na indução do crescimento anisotrópico por reação fotoquímica conduzida por luz UV, semelhante ao demonstrado por Tiziana Placido *et al* (103), conforme já comentado anteriormente. O ácido ascórbico atua na primeira redução do precursor de ouro Au (III) para Au (I). Ciclohexano promove a formação de micelas que auxiliam o crescimento anisotrópico e a acetona é o radical iniciador (103), que gera radicais cetil capazes de promover uma redução de Au (I) em Au (0), dando assim início ao crescimento dos nanobastões de ouro. Dois mecanismos principais são responsáveis pela formação do híbrido carbono-ouro: a presença de defeitos e sítios com diversos grupos funcionais na superfície do GO gera pontos de nucleação para nanopartículas que atuam como local de crescimento para os nanobastões, da mesma forma que na síntese via irradiação UV apresentado anteriormente; por outro lado, o GO tem carga predominantemente negativa devido à grande quantidade de grupos contendo oxigênio, assim ligações tipo van der Waals entre os nanobastões gerados fora do GO e a superfície do carbono é possível.

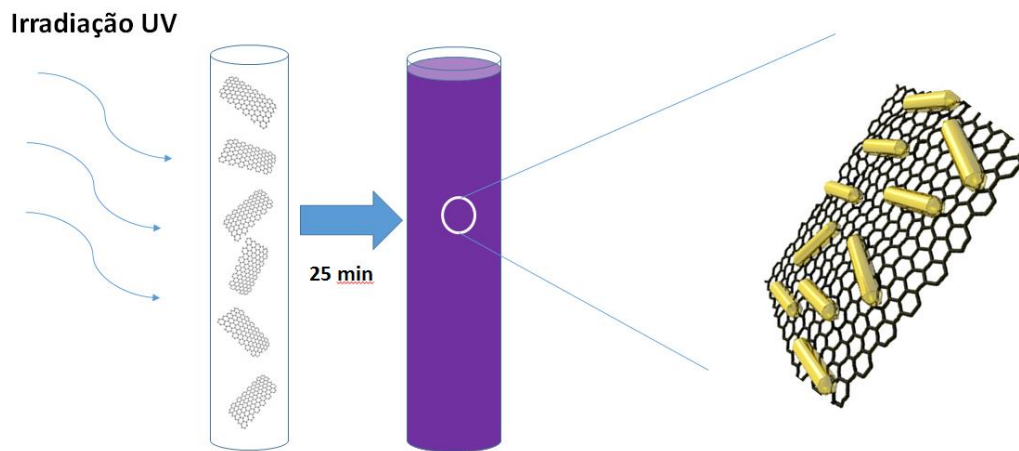


Figura 27 - Ilustração do processo de formação de híbridos entre óxido de grafeno (GO) e nanobastões de ouro.

A caracterização dos nanocompósitos foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e absorção óptica. Na figura 28 a-d temos as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando que os nanobastões de ouro estão suportados por folhas de óxido de grafeno em diferentes aumentos. Estas imagens mostram claramente um grande número de nanobastões eficazmente dispersos em folhas de óxido de grafeno. Além disso, as dimensões e proporções de aspecto dos nanobastões de ouro foi avaliada por análise estatística, resultando em uma relação de aspecto média de cerca de 3,5 (35 nm/10 nm), conforme mostrado na Figura 28 e). A ilustração do híbrido formado é mostrada na figura 28 f).

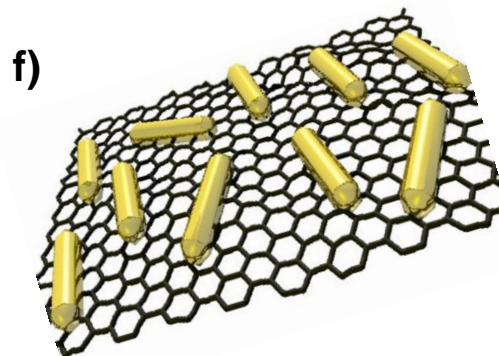
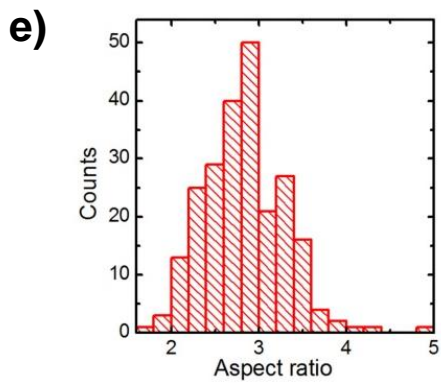
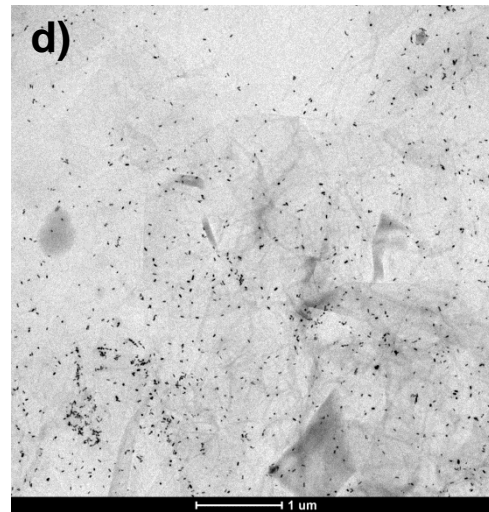
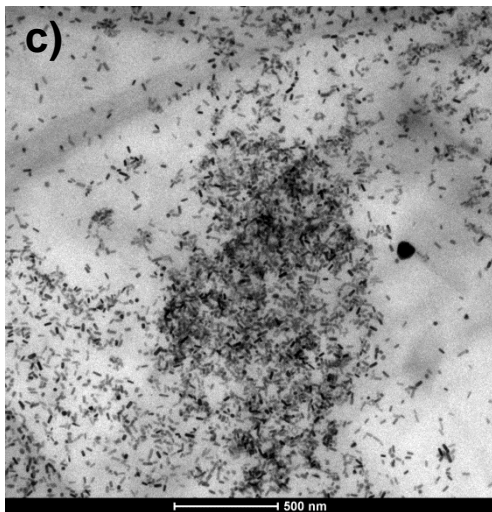
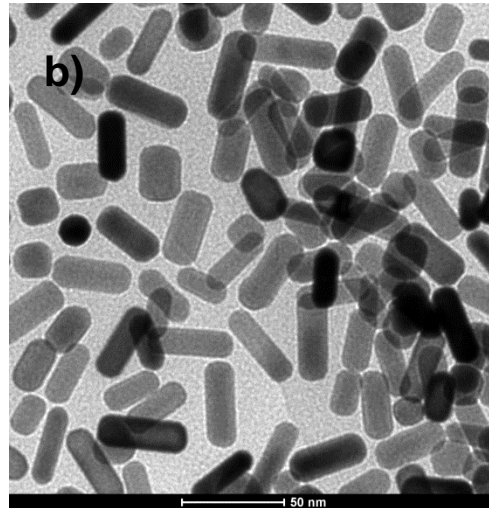
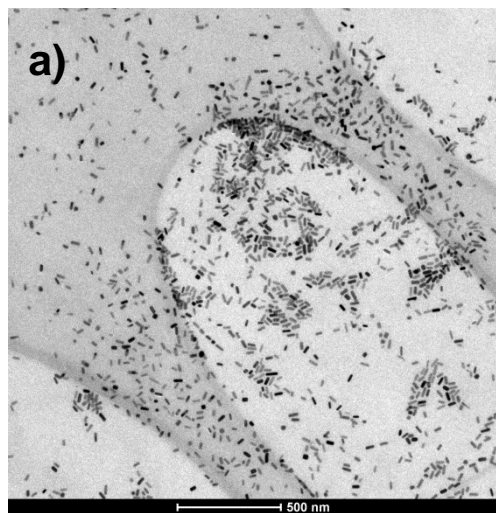


Figura 28 - (a-d) imagens de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando que os nanobastões de ouro estão suportados por folhas de óxido de grafeno em diferentes aumentos, em e) análise estatística, e em f) ilustração do híbrido formado.

A ressonância de plasmon dos nanocompósitos foi verificada por meio de absorção óptica em solução aquosa. A figura 29 mostra os espectros de UV-VIS-NIR, dos nanobastões sintetizados separadamente, do nanocompósito com óxido de grafeno e do óxido de grafeno puro. Os nanobastões foram sintetizados pelo mesmo processo descrito anteriormente, mas sem a presença de GO; o seu espectro de absorção óptica é mostrado em azul na Figura 29. Nesta figura, temos que o espectro dos nanobastões puros apresenta dois picos, um em 514 e outro em 750 nm, correspondendo, respectivamente, ao plasmon transversal e ao plasmon longitudinal. Quando a síntese é realizada na presença de GO é observado um aumento do pico transversal e um amortecimento do pico longitudinal. Além disso, o pico de ressonância longitudinal é deslocado para 740 nm quando os nanobastões de ouro são crescidos sobre o GO. O amortecimento do pico referente ao plasmon longitudinal e o aumento do pico de plasmon transversal está associado a uma forte interação da superfície lateral dos nanobastões de ouro com o óxido de grafeno, e com a mudança do meio dielétrico local em torno da superfície dos nanobastões e também ao aumento da polidispersão quando a síntese é realizada na presença de GO.

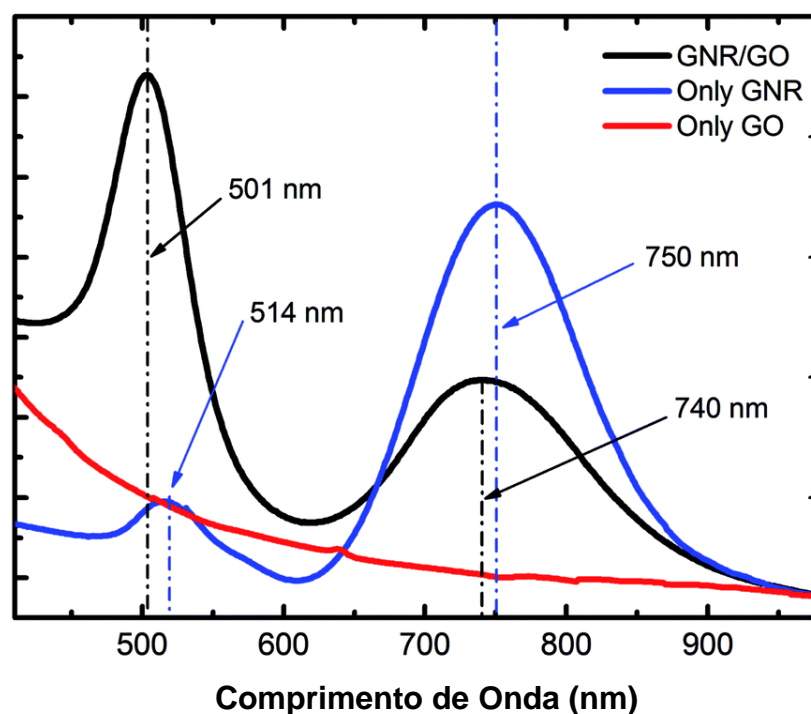


Figura 29 - Espectros de Absorção óptica UV-VIS-NIR, dos nanobastões sintetizados separadamente (Azul), do híbrido com óxido de grafeno (Preto), e do óxido de grafeno puro (vermelho).

Para a aplicação dos nanocompósitos formados como substratos para SERS, o material foi depositado sobre substrato de vidro formando um filme. Isso foi realizado através de filtração a vácuo. Na figura 30a, temos uma fotografia do filme formado, em b, temos uma imagem óptica do substrato tirada com uma lente de 10 X. Essa imagem dá uma ideia geral do substrato e de sua homogeneidade. Em c, imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A caracterização por MEV em baixa resolução foi realizada no microscópio JEOL JSM - 6360LV, com o objetivo de verificar a morfologia do substrato, e a presença de defeitos e impurezas. Na figura 30d, temos uma imagem de elétrons retro-espalhados do substrato, em baixo aumento. Esta imagem mostra a boa uniformidade do filme formado e regiões de maior desvio do feixe de elétrons. Essas regiões são formadas por acúmulo de ouro, principalmente bordas do grafeno, já que pelo processo de síntese utilizado, os nanobastões crescem preferencialmente nestas regiões devido a grupos funcionais

presentes nas bordas do óxido de grafeno. Pelas imagens em baixa resolução também percebemos as dobras do grafeno no substrato. A caracterização em alta resolução foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura FEG - Quanta 200 FEI. O objetivo é a caracterização em escala nanométrica do substrato formado, a identificação das nanoestruturas de ouro e sua distribuição sobre o substrato. Na figura 30e, temos uma imagem de elétrons retro espalhados do substrato em alta resolução. Nesta percebemos claramente a presença dos nanobastões de ouro sobre o substrato, e verificamos também regiões de maior aglomeração de nanobastões, como já visto antes nas imagens em baixa resolução. As imagens em alta resolução comprovam então, que as regiões mais claras e, conseqüentemente, com maior quantidade de ouro, mostradas na figura 30c (imagem em baixa resolução), são mesmo regiões com maior quantidade de nanobastões de ouro. Isso se deve ao crescimento preferencial em regiões de contorno do óxido de grafeno.

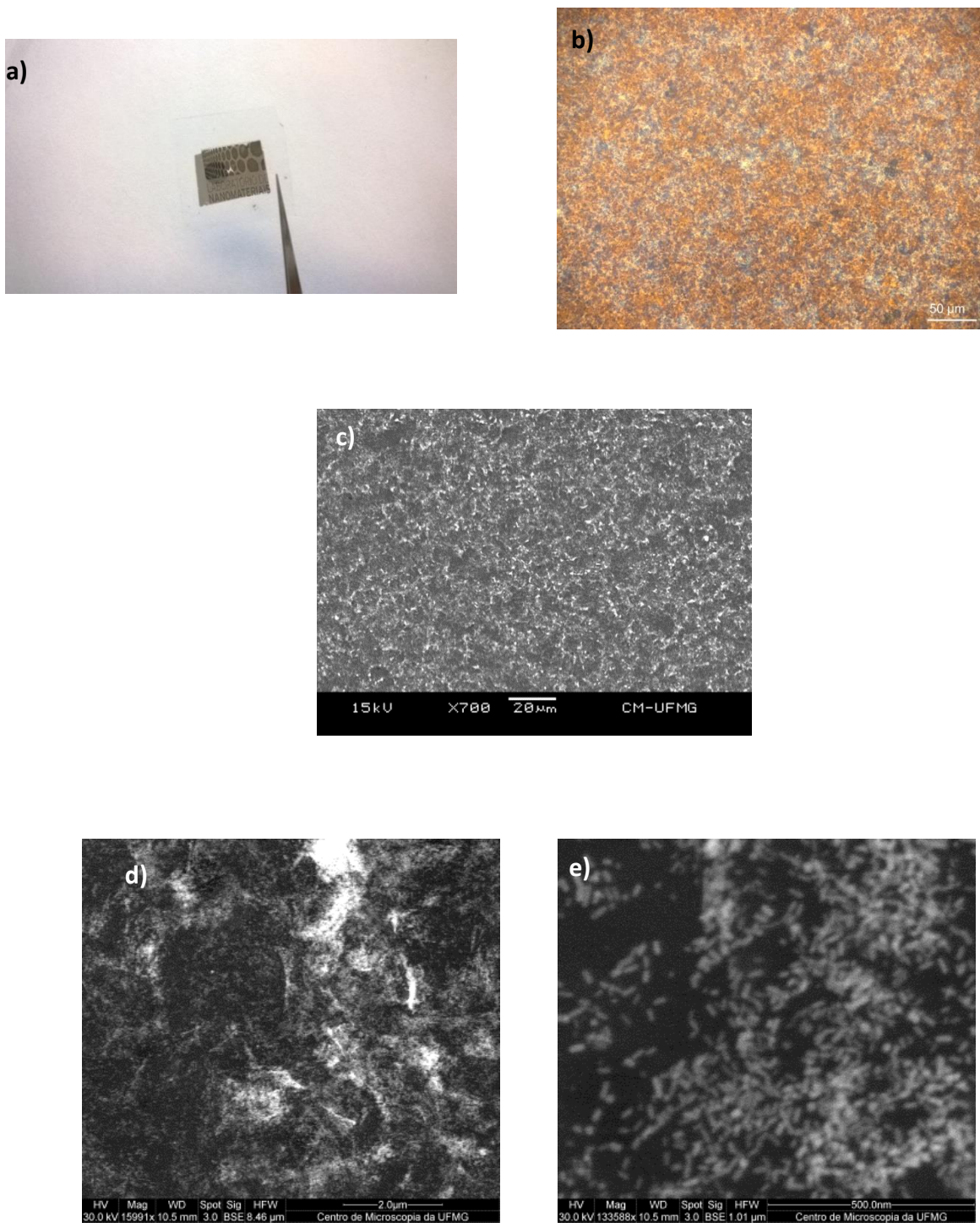


Figura 30 - Caracterização do filme formado pelo nanocompósito entre GO e nanobastões de ouro. a) fotografia do filme, b) imagem de microscopia ótica, c, d e e) imagens de microscopia eletrônica de varredura em diferentes aumentos.

O espectro de absorção óptica do filme é mostrado na Figura 31. Neste espectro percebemos claramente que o perfil de absorção dos nanobastões de ouro se mantém sobre o filme, apresentando dois picos, correspondendo, respectivamente, ao plasmon transversal e ao plasmon longitudinal. O pico transversal está em 533 nm e o longitudinal em 706 nm. Comparando com as medidas de absorção dos nanocompósitos em solução, figura 29, o pico longitudinal é deslocado de 740 nm para 706 nm, e o transversal vai de 506 nm para 533 nm. Isso se deve à interação entre o óxido de grafeno e os nanobastões de ouro. Percebemos também que a absorção óptica do GO, na região do ultravioleta está presente. Este valor indica que o comprimento de onda que deve ser aplicado para obter o modo de ressonância quando o material é depositado como um filme.

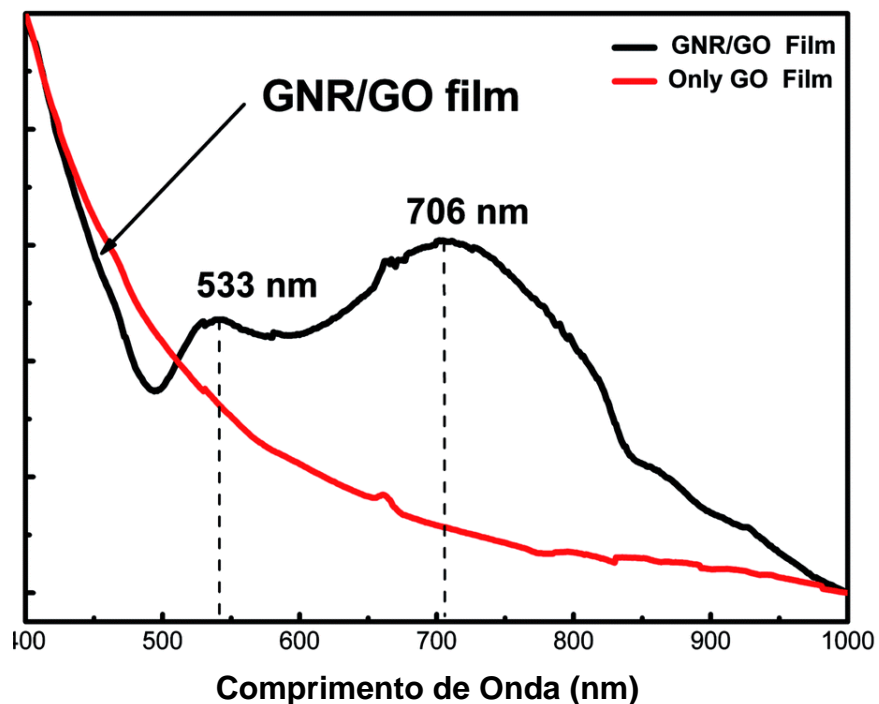


Figura 31 - Espectro de absorção óptica do filme formado apenas com GO (Vermelho) e pelo nanocompósito entre óxido de grafeno e os nanobastões de ouro (preto).

## 3.5 - Síntese de nanocompósitos entre Nanotubos de Carbono e nanobastões de ouro

---

### 3.5.1 - Funcionalização dos Nanotubos de carbono

A funcionalização dos nanotubos de carbono utilizando ácido nítrico e sulfúrico baseou-se nos métodos bem conhecidos na literatura (104). Nessa metodologia, os nanotubos de carbono foram submetidos a um tratamento oxidativo com ácido nítrico (65%) a uma temperatura de 90 °C durante 15 minutos em micro-ondas. Neste processo grupos funcionais oxigenados e aminados são introduzidos nos nanotubos, empregando-se uma razão volume de ácido nítrico/massa de nanotubos igual a 50 mL HNO<sub>3</sub>/1g NTC. Assim, 250 mL de HNO<sub>3</sub> (65%) foram misturados a 5 g de nanotubos, utilizando para isso, um balão de 500 mL. Por fim faz-se a retirada do ácido e várias lavagens com água para acerto do pH para aproximadamente 5. Depois dos nanotubos funcionalizados, eles passam por uma etapa de secagem a temperatura de 60 °C. Eles então são dispersos em água deionizada na concentração de 0,6 mg de nanotubos de carbono para 10 mL de água e ultrasonificados em ultrassom de ponta por 10 minutos para melhora a dispersão dos nanotubos.

### 3.5.2 - Caracterização dos Nanotubos de carbono

A morfologia das amostras dos nanotubos de carbono foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão e a análise termogravimétrica foi realizada por TG. Na figura 32, temos imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos nanotubos de carbono utilizados.

Na figura 33 a-b, temos os gráficos de TG das amostras de nanotubos de carbono. A análise termogravimétrica foi realizada com a finalidade de se avaliar a estabilidade dos nanotubos de carbono em atmosfera oxidante, bem como a influência da funcionalização sobre esta propriedade. As análises termogravimétricas foram realizadas com razão de aquecimento de 10 °C/min entre 25 °C e 800 °C em fluxo de 100 mL/min de ar sintético ultra seco. A massa de amostra empregada nas análises foi em torno de 2 – 3 mg. A caracterização

termogravimétrica da amostra dos nanotubos, figura 33, mostra apenas uma etapa de decomposição oxidativa de componentes com carbono entre 450 e 650 °C, o que é um resultado típico. Já as amostras de nanotubos funcionalizados mostraram perdas de massa abaixo de 400 °C e em diferentes temperaturas, o que de acordo com a literatura pode ser atribuído aos grupos ligados às paredes dos nanotubos. Os resultados de TG (Fig. 33) mostram a presença de grupos funcionais oxigenados inseridos nos tubos, os quais se decompõem abaixo de 400 °C. Tais grupos funcionais criam defeitos nas paredes mais externas dos nanotubos.

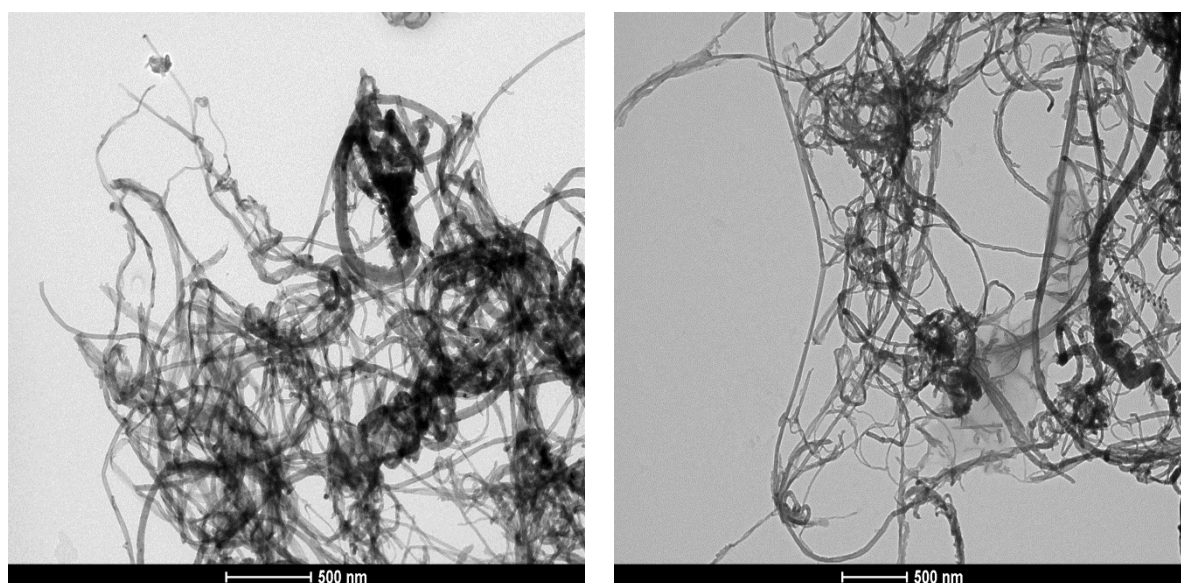


Figura 32 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanotubos dos carbono.

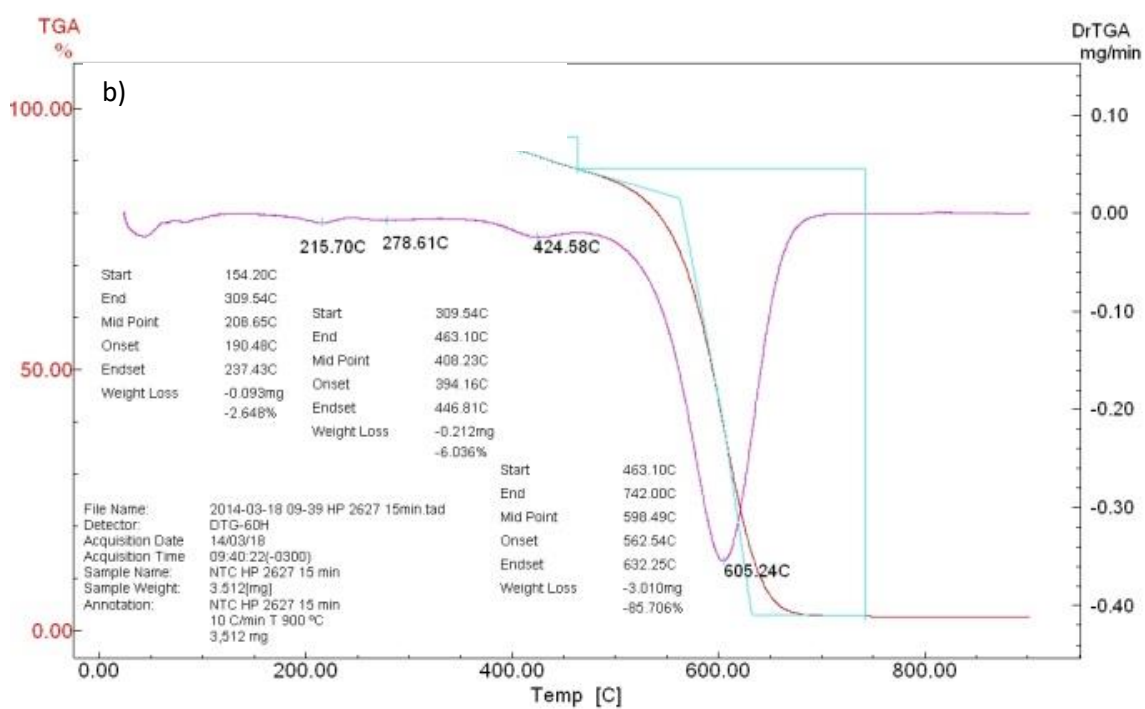
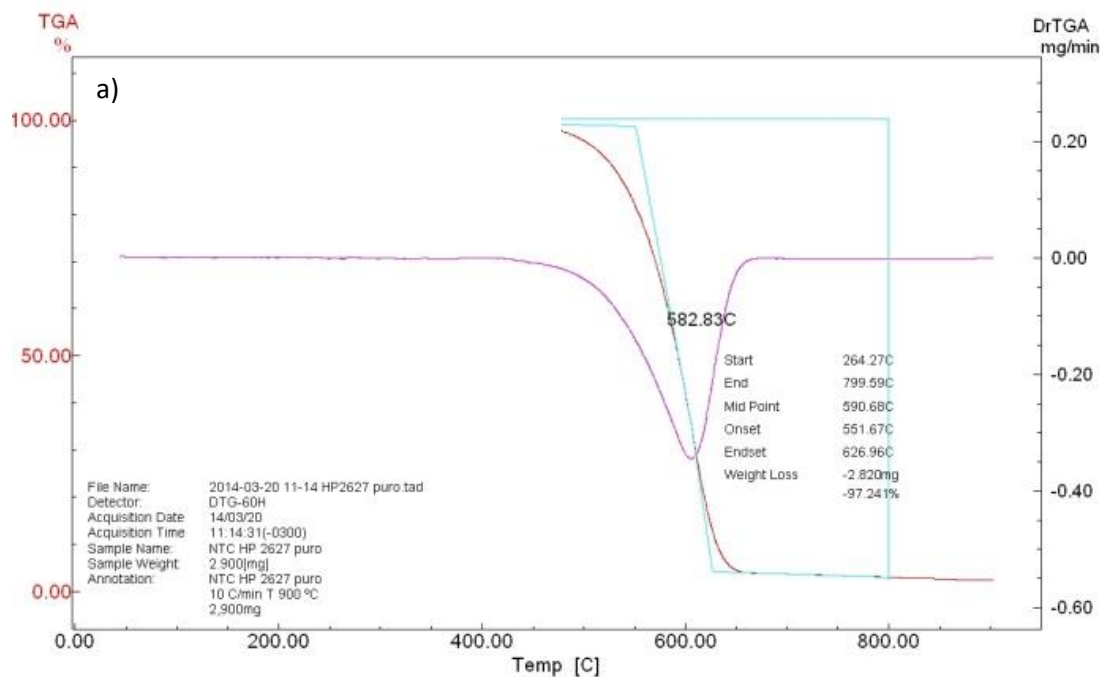


Figura 33 – Termogravimetria dos nanotubos de carbono.

### 3.5.3 - Síntese de nanocompósitos entre Nanotubos de carbono e Nanobastões de ouro.

Para a síntese dos nanocompósitos formados por nanotubos de carbono e nanobastões de ouro, primeiro, foi preparada uma solução de 15 mL (0,1 M) de CTAB, sendo que em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L (0,1 M) de  $\text{HAuCl}_4$ . A solução foi agitada durante 15 minutos. Em seguida, foi adicionado em sequência 1 mL (0,5 mM) de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), 400  $\mu$ L ciclohexano, 330  $\mu$ L de acetona e 100  $\mu$ L de ácido ascórbico ( $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_8$ ), a solução mudou de amarelo para transparente. Finalmente, adicionou-se 5 mL de nanotubos de carbono (0,6 mg/10 mL), sendo então colocada sob irradiação UV durante 25 minutos (Figura 35). Após este processo, a solução de híbridos formados por nanotubos de carbono e nanobastões de ouro em CTAB é obtida. Terminada a reação, o excesso de CTAB foi removido da solução, por meio de três ciclos de centrifugação (5600g durante 10 min) e o material híbrido disperso em água deionizada 18,2 mohms. Neste processo de síntese, as reações fotoquímicas promovem o crescimento de nanobastões de ouro, sendo que o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) atua como surfactante, direcionando o crescimento para morfologia anisotrópica, o ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) é o precursor de ouro, o nitrato de prata atua na indução do crescimento anisotrópico conforme já comentado anteriormente para a síntese de nanobastões puros e com o híbrido com GO. O ácido ascórbico atua na primeira redução do precursor de ouro Au (III) para Au (I). Ciclohexano promove a formação de micelas que auxiliam o crescimento anisotrópico e a acetona é o radical iniciador (103), que gera radicais cetil capazes de promover uma redução de Au (I) em Au (0), dando assim início ao crescimento dos nanobastões de ouro.

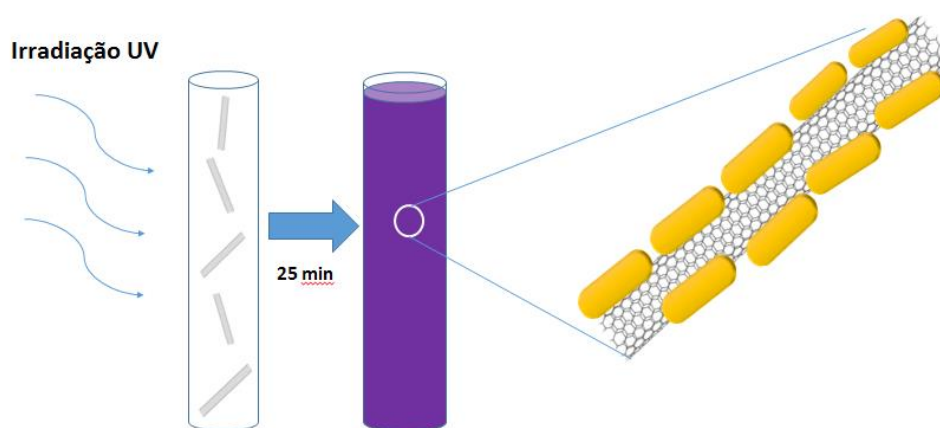


Figura 34 - Ilustração do processo de formação de híbridos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro.

A caracterização dos nanocompósitos foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e absorção óptica. Na figura 36 (a-d) temos as imagens de microscopia eletrônica de transmissão em diferentes aumentos, mostrando que os nanobastões de ouro estão suportados pelos nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Estas imagens mostram claramente um grande número de nanobastões de ouro nos nanotubos de carbono. A ilustração do híbrido formado é mostrada em 36a. Os nanobastões acoplados na superfície dos nanotubos geram muitos pontos de hot-spot onde os campos elétricos criados por eles interagem estabelecendo uma região de grande aumento de campo elétrico. Isso é excelente para as medidas SERS, como veremos na próxima sessão.

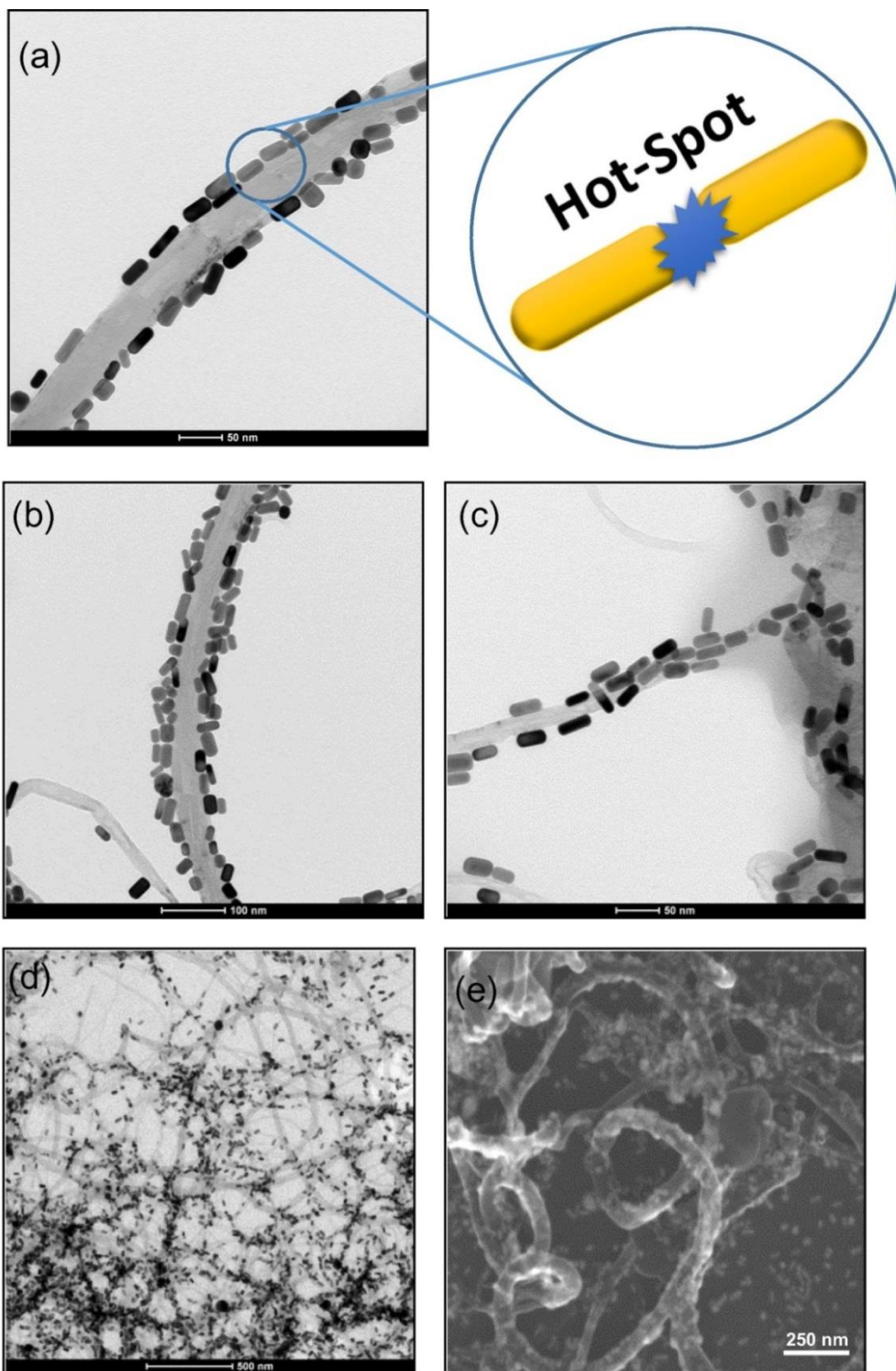


Figura 35 - (a-d) imagens de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando que os nanobastões de ouro estão suportados por nanotubos de carbono em diferentes aumentos, em e) imagens de microscopia eletrônica de varredura.

A ressonância de plasmon foi verificada por meio de absorção óptica em solução aquosa. A figura 36 mostra os espectros de UV-VIS-NIR, dos nanobastões sintetizados separadamente (curva preta) e do nanocompósito com nanotubos de carbono (curva vermelha). Os nanobastões foram sintetizados pelo mesmo processo descrito anteriormente, mas sem a presença de nanotubos. Nesta figura temos que o espectro dos nanobastões puros apresentam dois picos, um em 514 nm e outro em 723 nm, correspondendo, respectivamente, ao plasmon transversal e ao plasmon longitudinal. Quando a síntese é realizada na presença de nanotubos de carbono funcionalizados é observado uma diminuição do pico de plasmon longitudinal, ao contrário do que acontece para os nanocompósitos com óxido de grafeno, figura 29. Além disso, o pico de ressonância longitudinal é deslocado para 686 nm quando os nanobastões de ouro estão nos nanotubos de carbono, comportamento esperado quando uma interação entre eles ocorre.

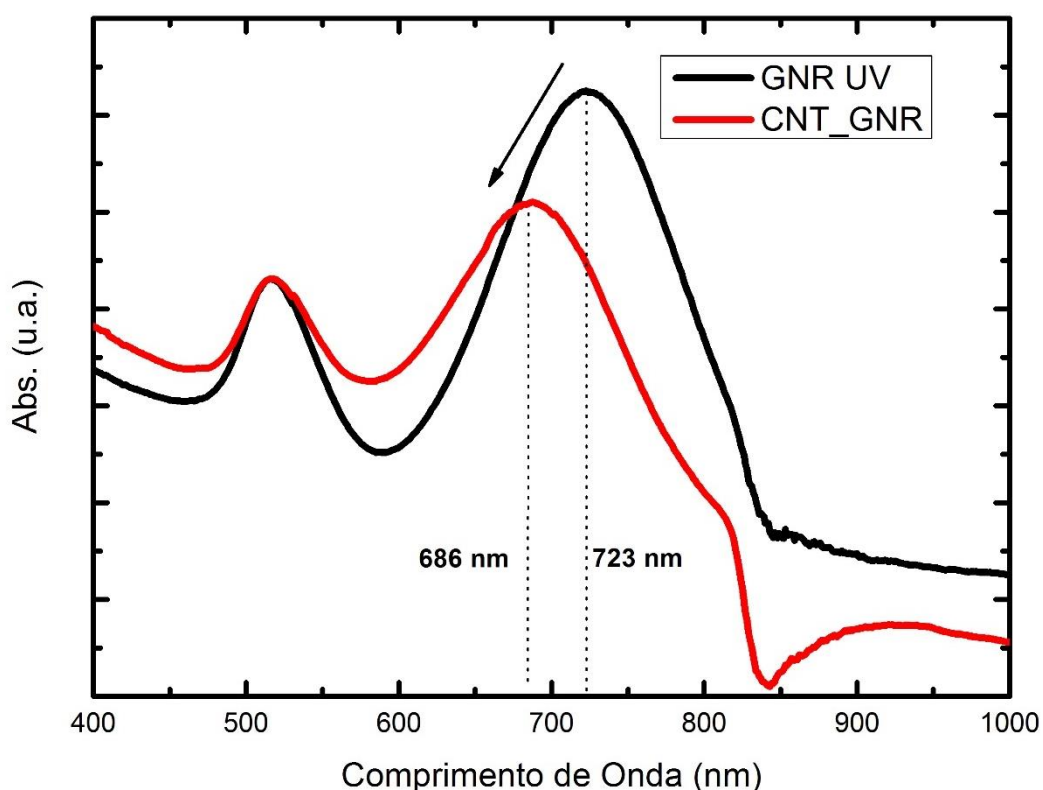


Figura 36 - Espectros de Absorção óptica UV-VIS-NIR, dos nanobastões sintetizados separadamente (preto), e do nanocompósito com nanotubos de carbono (vermelho).

Para explicar a formação dos nanocompósitos entre o óxido de grafeno ou nanotubos de carbono com os nanobastões de ouro, nós postulamos a existência de dois mecanismos principais. O primeiro deles trata de interação eletrostática do tipo van der Waals, isso porque a carga dos nanobastões de ouro é positiva devido à presença de uma monocamada de CTAB formada durante seu processo de crescimento. Por outro lado, o GO é abundante em grupos funcionais constituídos de oxigênio, tais como carboxila, hidroxilas etc. A presença destes grupos torna os nanotubos de carbono negativamente carregados, o que favorece a interação entre eles. Já os nanotubos de carbono estão funcionalizados com grupos carboxila na superfície. Desta forma, eles têm carga predominantemente negativa. Outro mecanismo que pode estar ocorrendo é o crescimento direto dos nanobastões em regiões funcionalizadas e de defeitos no GO ou de funcionalização nos nanotubos. Isso se deve porque os íons de ouro tendem a se aglomerar nestas regiões por atração também eletrostática, formando pequenas ilhas de ouro que serviriam de base para o crescimento dos nanobastões, como ocorre no método mediado por semente. Desta forma os nanobastões crescem diretamente sobre as folhas do GO e nos nanotubos. Postulamos que estes dois mecanismos ocorrem simultaneamente, o que resulta na grande quantidade de nanobastões depositados sobre os materiais de carbono.

# Parte Experimental

---

Experimentos SERS

**Nesta sessão são apresentados os procedimentos e resultados das medidas de SERS.**

## 3.6 - Experimentos SERS

### 3.6.1 - Moléculas modelo para experimentos SERS

Para estudos de SERS nos substratos desenvolvidos, os corantes aromáticos cresyl violeta, azul de metileno e rodamina R6G foram utilizados como moléculas modelo. Na figura 38, temos as fórmulas químicas dos dois corantes e, na figura 39, os espectros de absorção óptica.

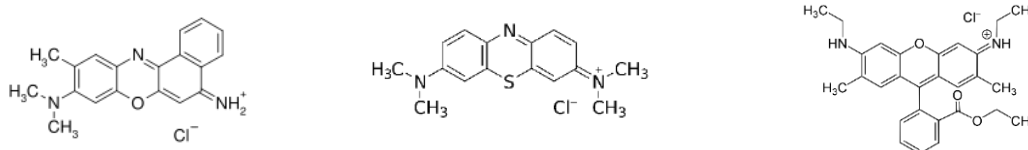


Figura 37 - Formulas químicas dos corantes utilizados como moléculas modelo para medidas de SERS.

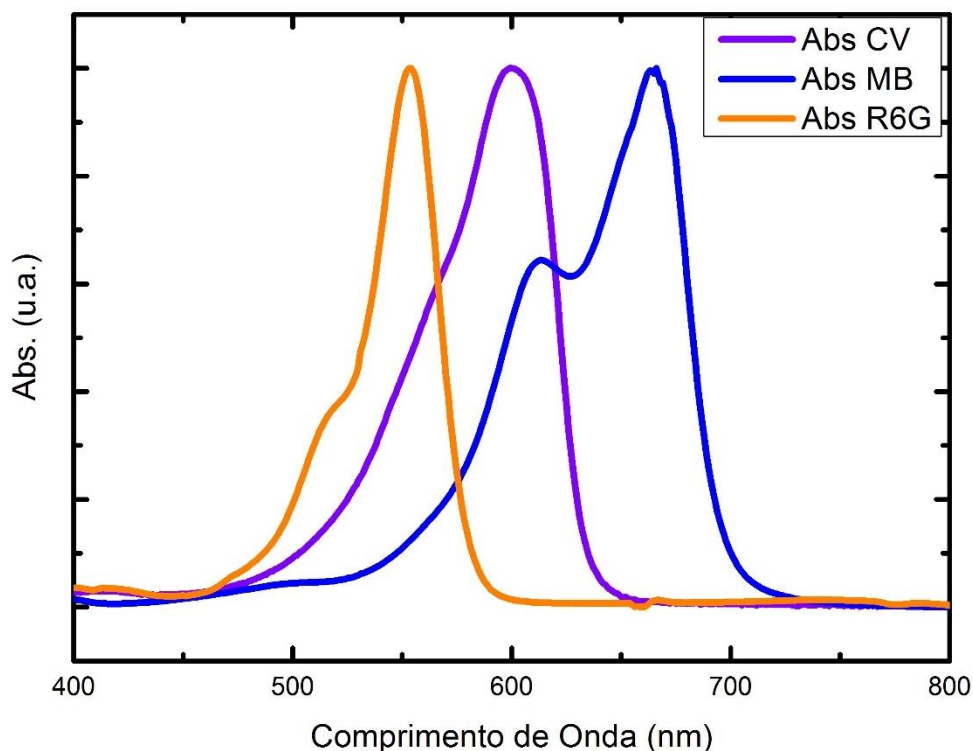


Figura 38 - Espectro de absorção óptica dos corantes utilizados.

Pelos espectros de absorção óptica das moléculas, percebemos que sua absorbância é máxima na região visível do espectro. Medidas com lasers em comprimentos de onda nesta faixa poderia indicar aumento de sinal devido ao fenômeno de Raman ressonante (105). Para evitar essa situação e observa o fenômeno de SERS, as medidas SERS foram realizadas com laser na região do infravermelho do espectro, ou fora da região de absorção máxima dos corantes.

Na figura 39 temos o espectro Raman do cresyl violeta obtido da referência (106), para comparação. A molécula de cresyl violeta apresenta picos no espectro rama bem intensos em  $591\text{ cm}^{-1}$ ,  $915\text{ cm}^{-1}$ ,  $1180\text{ cm}^{-1}$ ,  $1370\text{ cm}^{-1}$ ,  $1621\text{ cm}^{-1}$ , sendo as bandas em  $591\text{ cm}^{-1}$  e  $1621\text{ cm}^{-1}$  as mais intensas. Ambos os sinais são causados por modos vibracionais planares. Esta molécula foi escolhida como molécula modelo, por ser facilmente disponível, apresentar um sinal Raman bem característico e ser solúvel em etanol. Um estudo completo do sinal Raman e SERS desta molécula pode ser encontrado no trabalho de W. Kiefer *et al* (107).

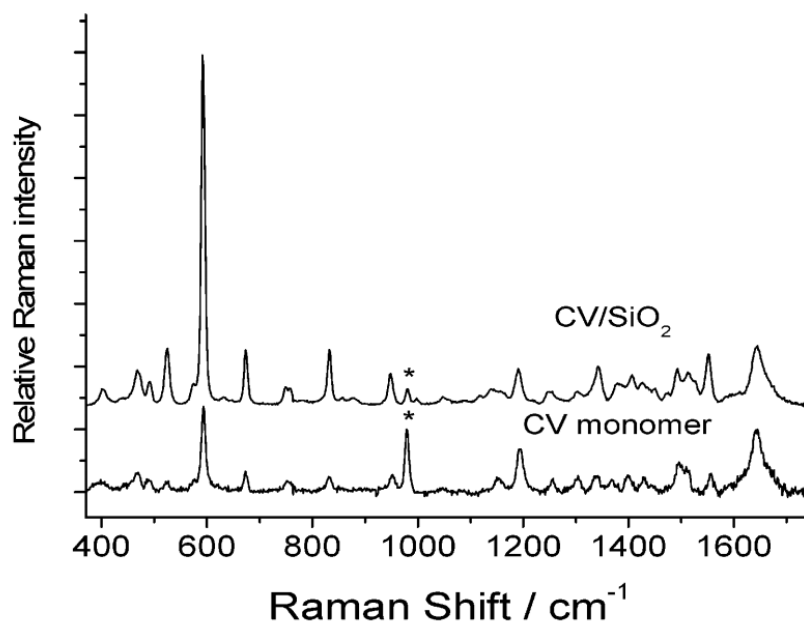


Figura 39 - Espectro Raman do cresyl violeta obtido da referência (106).

Outro corante empregado como molécula modelo é o azul de metileno. Na figura 40 temos seu espectro Raman obtido da referência (108). Observamos neste espectro que a molécula de azul de metileno tem dois picos característicos em torno de 1618 e 445  $\text{cm}^{-1}$  que são atribuídos a ligações C-C e alongamentos C-N-C respectivamente. As bandas em 883, 1052 e 1095  $\text{cm}^{-1}$  são originadas do etanol. Para caracterizar mais a eficiência dos substratos foram realizadas medidas com o corante Rodamina R6G cujo espectro é mostrado na figura 41 (109).

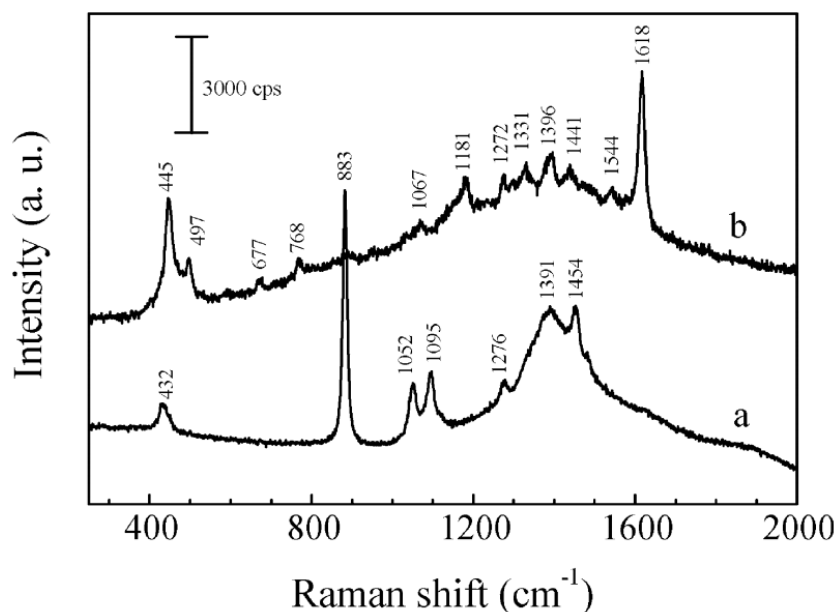


Figura 40 - Espectro Raman do azul de metileno obtido da referência (108).

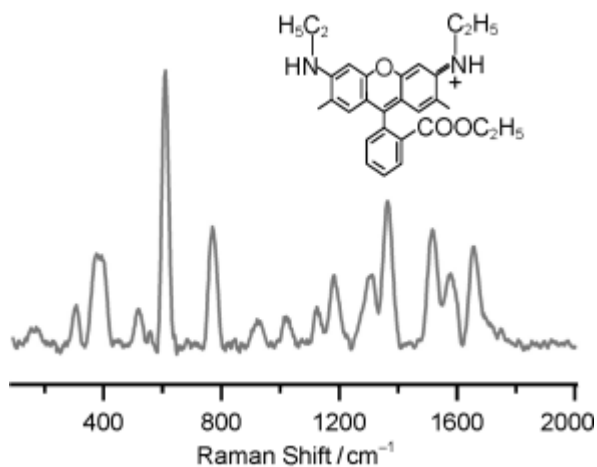


Figura 41 - Espectro Raman da Rodamina R6G.

### 3.6.2 - Procedimentos Experimentais

Para a preparação dos substratos de SERS, foram utilizadas duas metodologias: a primeira foi a formação de filmes finos dos nanocompósitos de óxido de grafeno com nanobastões de ouro; e a segunda foi a formação de um anel sobre substrato de silício com os nanocompósitos de nanotubos de carbono com nanobastões de ouro. Foram também realizadas medidas com nanobastões de ouro puros. A segunda metodologia foi aplicada devido à dificuldade de preparação de filmes com os nanobastões de ouro puros ou ligados com nanotubos de carbono. Este processo, porém, é o que apresenta os maiores fatores de aumento de sinal Raman.

As medidas das moléculas puras sem condição de SERS foram realizadas em vidro lavado em ultrassom com acetona, etanol e água. As experiências foram realizadas utilizando dois espectrômetros Raman, um deles o T64000 da Horiba e o outro o espectrômetro triplo Dilor XY. Os espectros Raman, medidos em um substrato de vidro padrão, foram realizadas com comprimentos de onda de excitação de 647 nm, com acumulação de 60 segundos. A potência do laser sobre a amostra foi mantida baixa a 1 mW, focalizado por meio de um microscópio com objetiva de 100x. Os espectros SERS foram registrados com os comprimentos de onda de excitação de 480 nm, 514 nm, 568 nm, 647 e 785 nm, com acumulação de 10 segundos. A potência do laser sobre a amostra foi mantida abaixo de 1 mW, focalizada por meio de uma objetiva de microscópio de 10x. O mapeamento SERS foi realizado em um Raman Microscope alpha 300 R (Witec), com comprimentos de onda de excitação de 633 nm, com acúmulo 0,3 segundos. Também a potência do laser sobre a amostra foi mantida abaixo de 1 mW, focalizada por meio de uma objetiva de 100X.

### 3.6.3 - Medidas SERS em nanobastões de ouro puros

Neste trabalho os estudos de SERS em nanobastões de ouro puros foram realizados utilizando os nanobastões sintetizados pelos métodos de crescimento mediado por semente. As medidas foram realizadas sobre um substrato de silício,

utilizando a simples abordagem de “pinga e seca”. O processo de evaporação do solvente forma um padrão conhecido como “efeito coffee ring”, em que as partículas se concentram em um anel. A alta concentração de partículas nesta região gera alta amplificação de sinal Raman como demonstrando por diversos autores (110), (111) e (112). Este processo foi utilizado porque demonstra alto índice de amplificação do sinal Raman via SERS, devido aos aglomerados e vários pontos de hot-spot, e também devido ao fato que a fabricação de filmes homogêneos com nanoestruturas de ouro se mostrou muito complicado e com resultados inferiores.

Para as medidas, foi realizada a limpeza dos substratos de silício em acetona, álcool isopropílico e água, em sonicação. Uma vez limpo, no substrato foram depositados 50 microlitros de nanobastões de ouro purificados em sua superfície. Após a evaporação do solvente (água) foi observado um anel como mostrado na figura 42. É então depositado 50  $\mu\text{L}$  de solução dos corantes em álcool sob este substrato. As medidas de SERS nesta amostra são mostradas na figura 43 para o CV ( $10^{-6}\text{M}$ ), e figura 44 para o azul de metileno ( $10^{-5}\text{ M}$ ). Estes resultados demonstram a observação do efeito SERS em nanobastões de ouro puros e alta amplificação do sinal Raman.

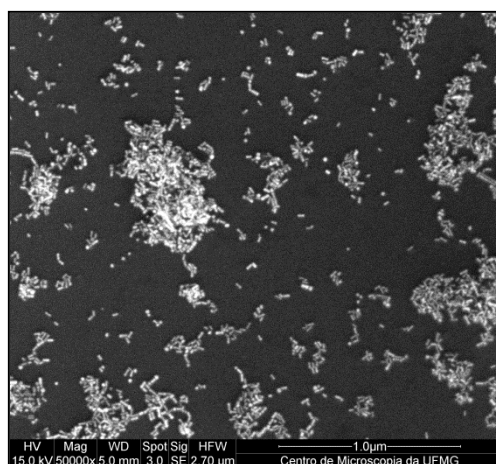
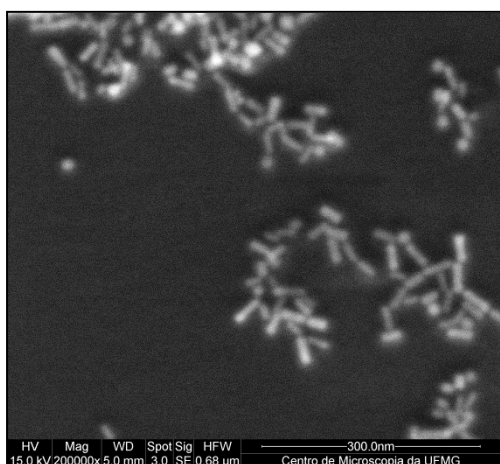
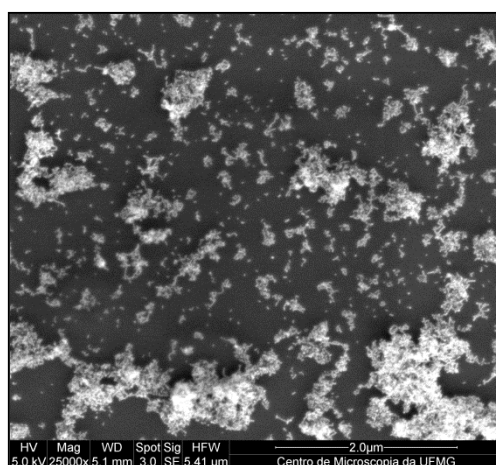
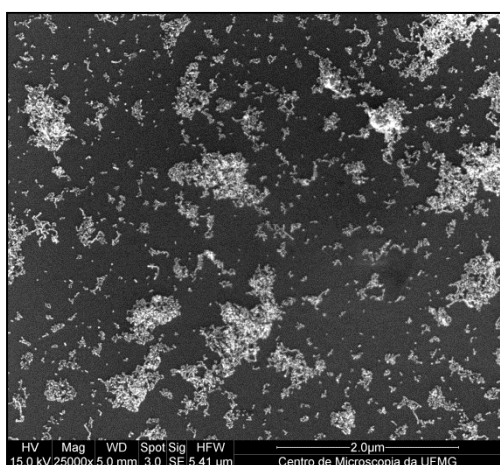
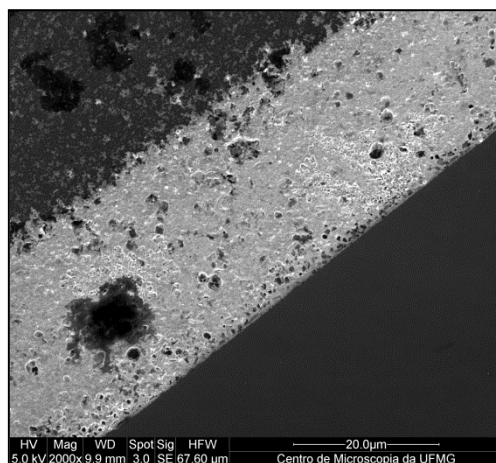


Figura 42 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de nanobastões de ouro sobre silício.

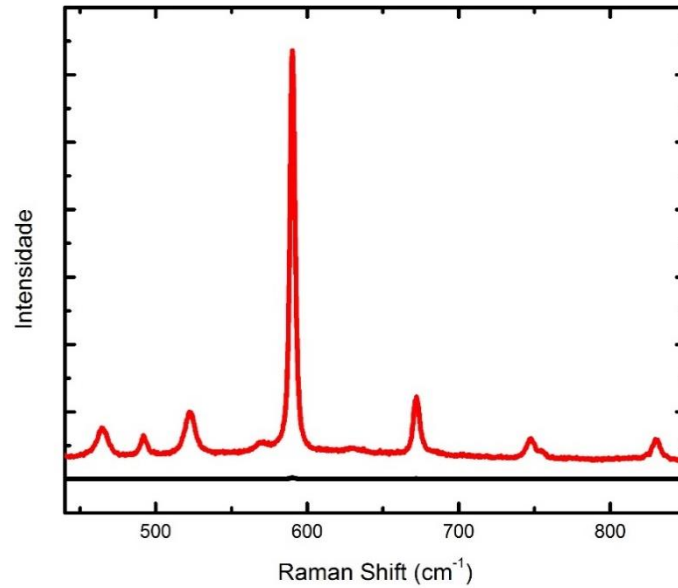


Figura 43- Espectro SERS do CV em nanobastões de ouro puros, em preto espectro Raman medido em vidro sem condição de SERS e, em vermelho o espectro medido sob o substrato mostrado grande amplificação do sinal Raman.

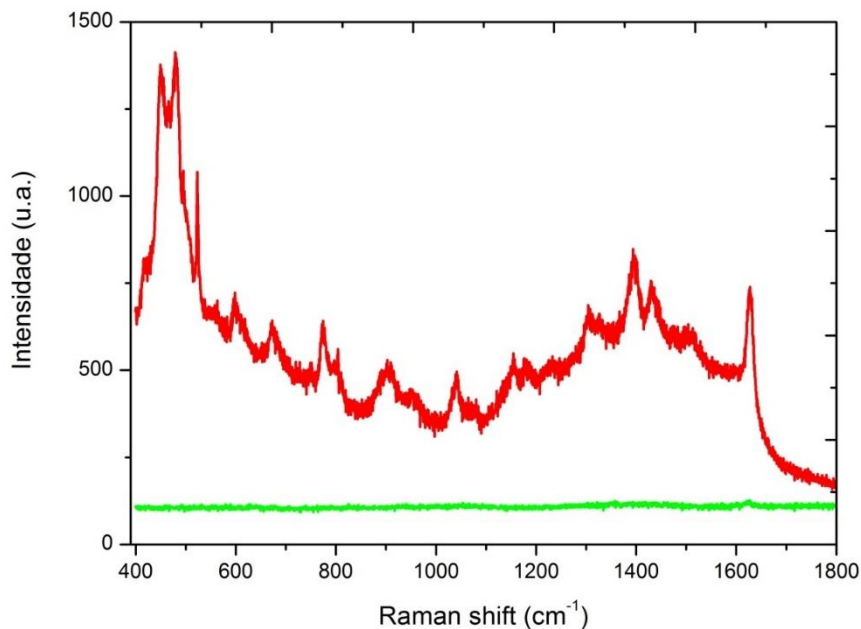


Figura 44 -Espectro SERS do MB em nanobastões de ouro puros, em verde espectro Raman medido em vidro sem condição de SERS e, em vermelho o espectro medido sob o substrato mostrado grande amplificação do sinal Raman.

### 3.6.4 - Medidas SERS no filme de óxido de grafeno e nanobastões de ouro

A solução de cresyl violeta dissolvida em etanol foi depositada em dois substratos, em vidro comum e no substrato de filme fino nanoestruturado com óxido de grafeno decorado com nanobastões de ouro. Em ambos os substratos foram utilizadas três concentrações de CV ( $10^{-5}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-11}$  M), contudo no substrato de vidro foi detectado um sinal muito fraco mesmo para as maiores concentrações, sendo observado sinal apenas com a concentração mais elevada. Por outro lado, o efeito SERS aparece claramente no filme fino nanoestruturado. A Figura 45 mostra o espectro Raman do CV em vidro, sem qualquer efeito, e sobre o substrato SERS, mostrando a detecção de um sinal excelente do CV em todas as concentrações. Temos neste espectro que o sinal diminui monotonamente com a concentração, o que é esperado. Como citado anteriormente, o sinal Raman do CV tem o pico mais intenso em  $591\text{ cm}^{-1}$ , de acordo com outros autores (W. Kiefer *et al* (107)).

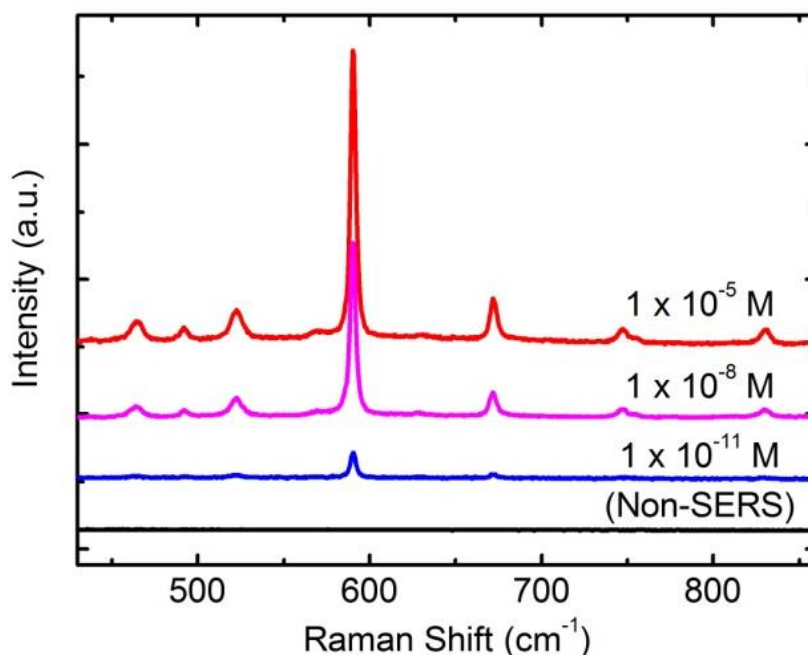


Figura 45 - Espectro SERS do CV em diferentes concentrações, medidas no substrato nanoestruturado com GO e nanobastões de Ouro. Em preto o espectro Raman do CV medido em substrato comum de vidro sem a demonstração do efeito SERS.

Para comprovar que as medidas apresentadas correspondem ao efeito SERS, e não a situações de pré-ressonância da molécula, medidas de SERS foram realizadas em comprimento de onda na região do infravermelho, muito distante assim da absorção do cresyl violeta. Na figura 46 temos o espectro Raman/SERS medido com o laser de comprimento de onda de 785 nm, sendo observado uma grande amplificação do sinal Raman, o que é esperado já que este comprimento de onda está mais próximo da ressonância dos nanobastões de ouro, gerando assim um campo elétrico muito mais intenso em sua volta. Mais adiante neste trabalho serão apresentadas medidas de SERS neste filme, em função do comprimento de onda do laser.

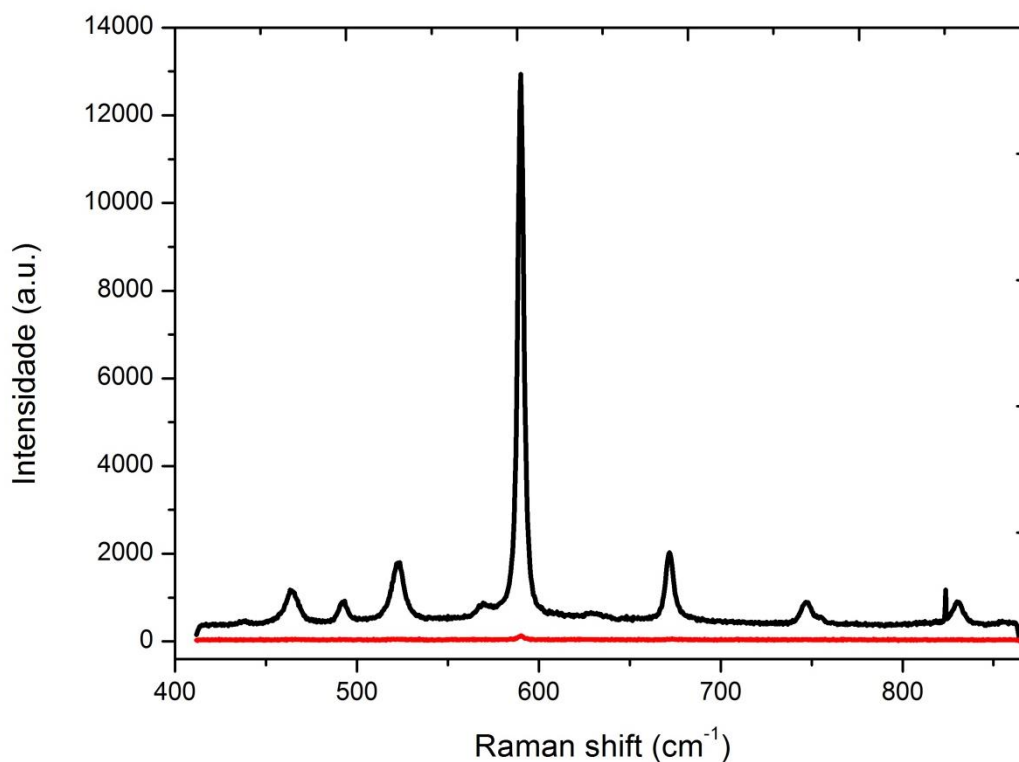


Figura 46 - Espectro Raman/SERS do CV (preto), medido na região do infravermelho. Em vermelho o espectro Raman do CV medido em substrato comum de vidro sem a demonstração do efeito SERS.

Percebemos nos espectros um enorme aumento de sinal Raman, possibilitando a detecção da molécula em uma concentração extremamente baixa ( $10^{-11}$  M). No entanto, a qualidade e uniformidade do substrato de SERS são fundamentais para o desenvolvimento de um substrato comercial. Para testar a qualidade e uniformidade do substrato de SERS, medidas em várias posições (R1, R2, R3, R4 e R5) do substrato foram realizadas, e estão mostradas na figura 47, para uma concentração de  $10^{-6}$  M e pouco tempo de acumulação (1s). Percebemos que a variação do sinal Raman não sofre grandes alterações em diferentes posições do substrato, mantendo um grande aumento de sinal. Um mapeamento do sinal Raman também foi realizado para atestar a uniformidade do substrato. Para este mapeamento o substrato foi mergulhado durante cerca de 20 segundos numa solução de  $10^{-7}$  molar de CV. A Figura 48a mostra a imagem óptica do filme como substrato e a Figura 48b mostra o mapeamento SERS. O mapeamento SERS descreve uma uniformidade do efeito SERS sobre o filme. A variação da intensidade em amarelo é causada principalmente pela profundidade de foco e os pontos negros representam regiões onde não há efeito SERS devido à distribuição irregular de moléculas. A figura 49 mostra as medidas do mapeamento variando o foco da lente objetiva, podemos perceber uma mudança na distribuição do sinal, atribuída à estruturação 3D do substrato, como demonstrado nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, figura 30.

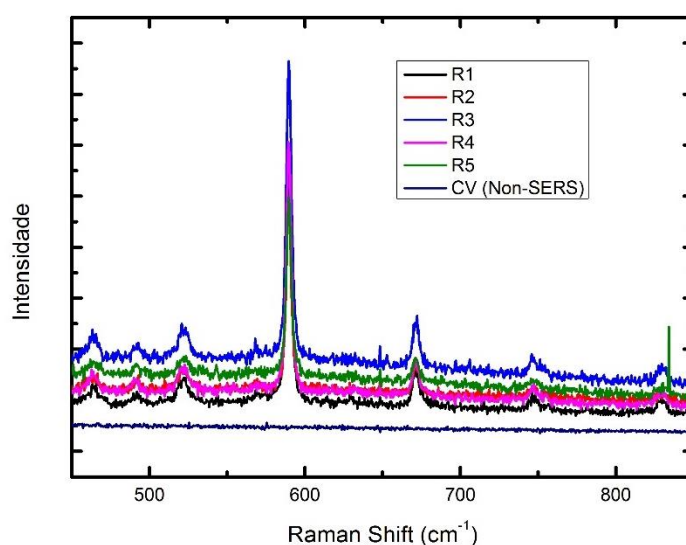


Figura 47 - Medidas SERS em várias regiões do substrato.

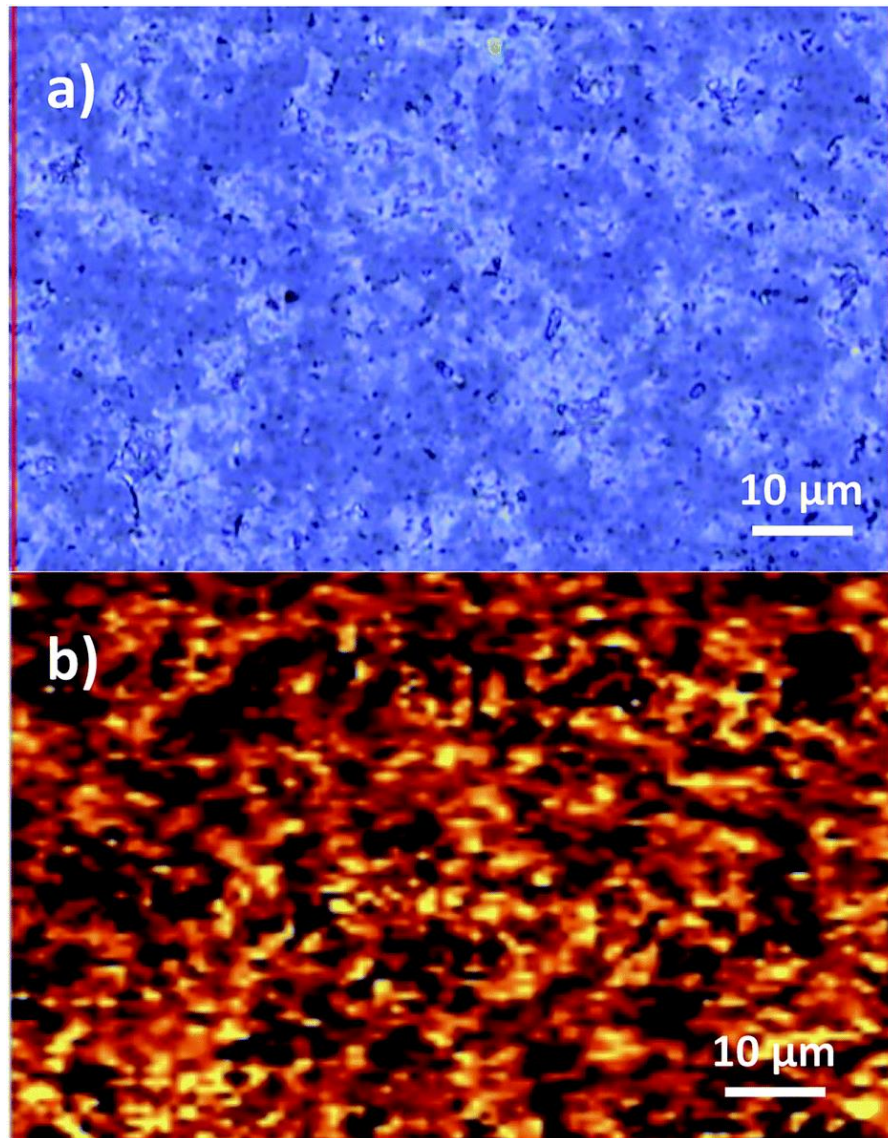


Figura 48 – a) imagem de microscopia ótica da área mapeada, b) Mapeamento SERS em substrato nanoestruturado com GO e nanobastões de Ouro, as regiões em amarelo são pontos de alto aumento de sinal Raman e em preto, regiões onde não é observado amplificação de sinal.

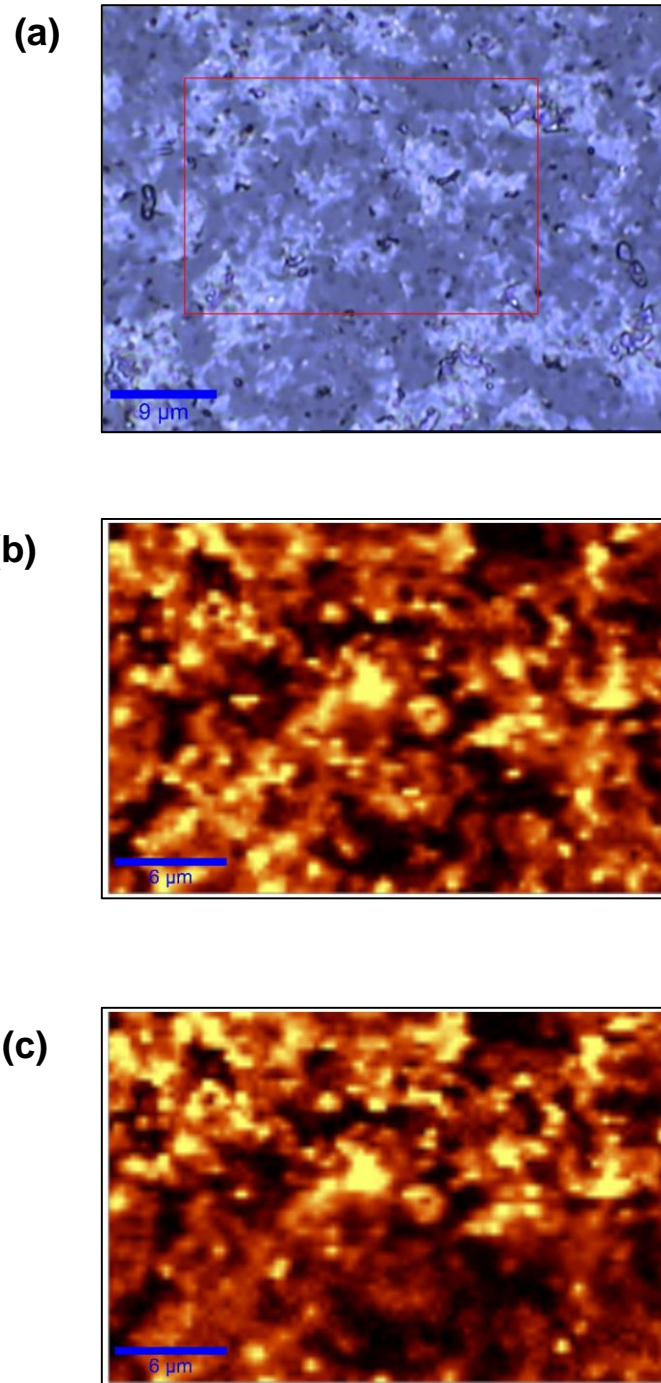


Figura 49 - Mapeamento SERS em substrato nanoestruturado entre GO e nanobastões de ouro, com diferentes distâncias focais: (a) imagem ótica, (b) e (c) mapeamento SERS.

Medidas SERS no substrato também foram realizadas usando como molécula modelo o azul de metileno e a rodamina R6G. Nas figuras 50 e 51 temos os espectros SERS do azul de metileno e da rodamina R6G, respectivamente.

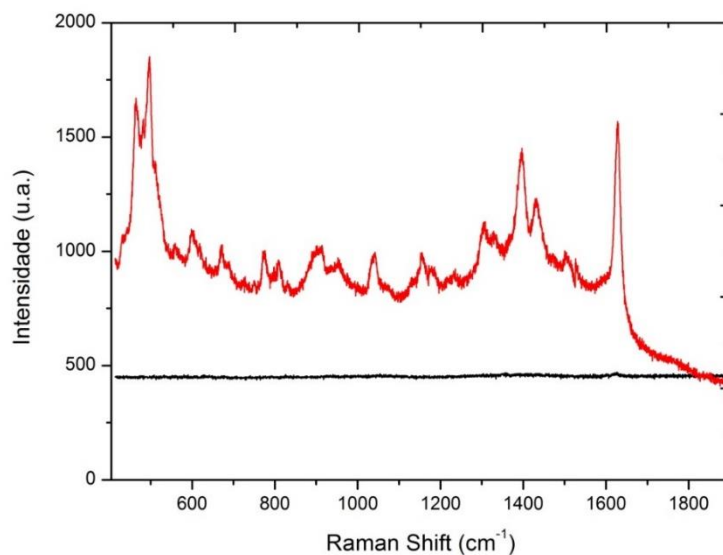


Figura 50 - Espectro SERS do azul de metileno em substrato nanoestruturado. Em preto, espectro Raman medido em vidro e, em Vermelho espectro Raman medido sobre o filme GO/nanobastões de ouro.

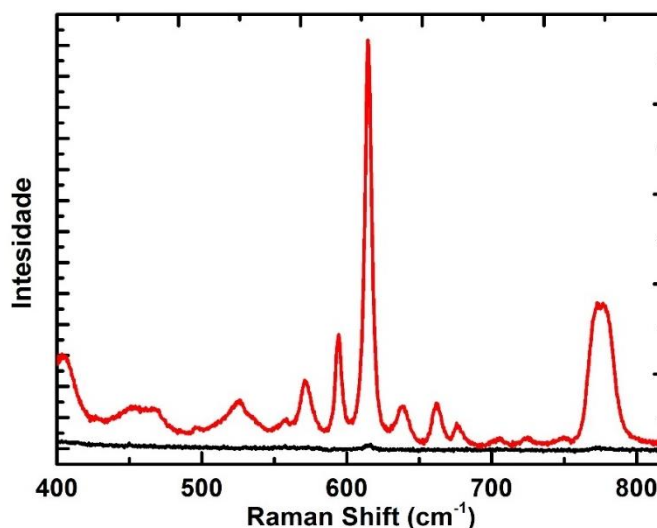


Figura 51 - Espectro SERS da Rodamina R6G. Em preto, espectro Raman medido em vidro e, em Vermelho espectro Raman medido sobre o filme GO/nanobastões de ouro.

### 3.6.5 - Janela de Ressonância

Medidas SERS foram realizadas em vários comprimentos de onda para avaliar as melhores condições de ressonância do laser de excitação com o filme. A figura 52 mostra as medidas SERS com comprimentos de onda de laser de 488 nm, 514 nm, 568 nm e 647 nm. O laser de 488 nm está fora de ressonância com os nanobastões de ouro e um sinal Raman muito fraco foi observado, mostrando claramente as bandas Raman D ( $1330\text{ cm}^{-1}$ ) e G ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ) do GO. O laser de 514 nm está perto da ressonância do modo transversal de plasmon dos nanobastões de ouro e foi observado um aumento significativo no sinal. A utilização dos lasers de 568 nm e 647 nm resultou em maiores aumentos do sinal de Raman, já que eles se aproximam da ressonância de plasmon longitudinal dos nanobastões de ouro no filme.

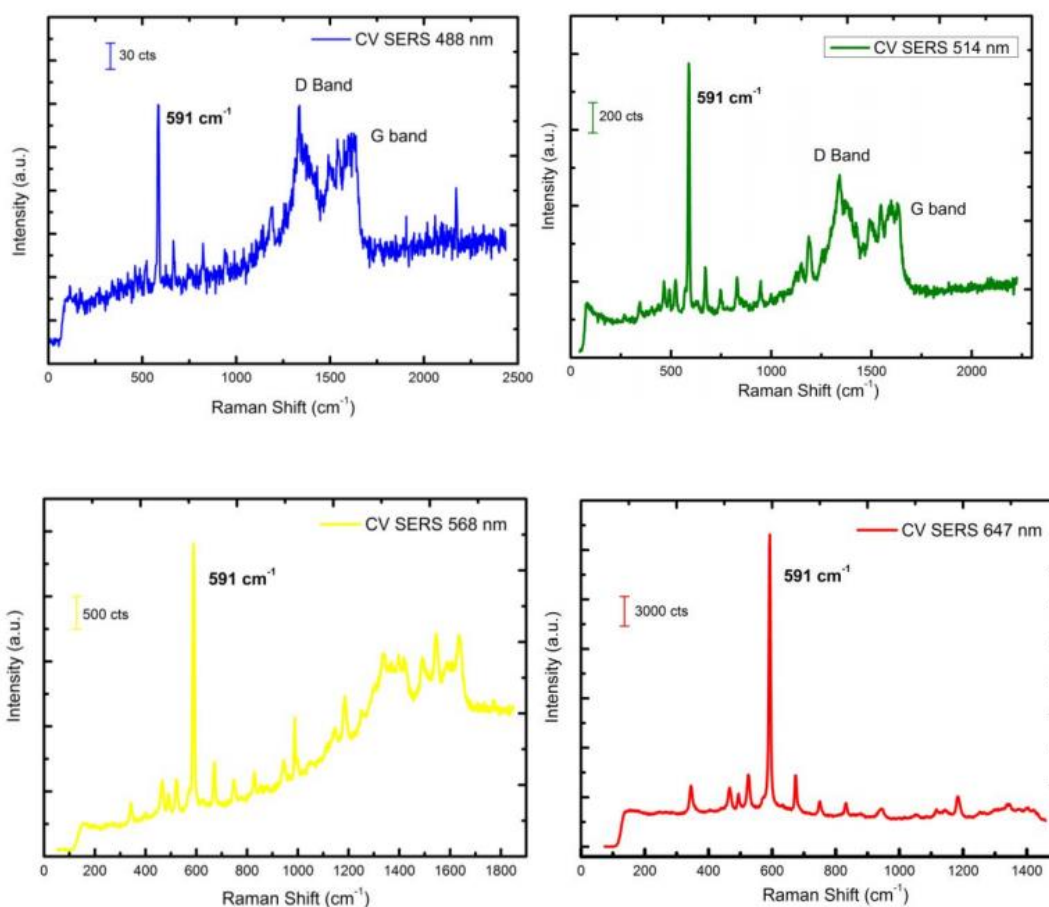


Figura 52 - Janela de ressonância sobre filme. Mostrando medidas realizadas com diversos comprimentos de onda.

### 3.6.6 - Medidas de SERS Químico.

O fato do GO ter em sua superfície grande quantidade de diversos grupos funcionais, e de ter grande afinidade com moléculas próximas, e poder transferir carga para moléculas afins, faz dele um ótimo candidato para estudar o “efeito SERS químico”, ou à amplificação do sinal Raman via transferência de carga entre o substrato e a molécula em estudo. Xinxin Yu *et al* (113) estudaram o efeito químico do óxido de grafeno para SERS, demonstrando entre outras coisas sua variação em função do estado de redução do GO. Neste trabalho, apresento a medida do “efeito SERS químico” do filme de GO, sobretudo para demonstrar que ele é fraco em relação ao efeito SERS eletromagnético, quando da presença dos nanobastões de ouro. Na figura 53, apresento o espectro SERS do cresyl violeta medido em um filme preparado apenas com o óxido de grafeno sem nanobastões de ouro. Esse filme foi transferido usando o mesmo processo usado para os filmes dos nanocompósitos. Em azul a medida sem SERS sobre uma lâmina de vidro convencional, a  $10^{-7}$  M, e em preto e vermelho medidas para diferentes concentrações de CV. Podemos perceber um pequeno aumento de sinal Raman desta molécula, o que comprova a observação do efeito químico para as medidas de SERS. Esse aumento do sinal Raman é causado pela transferência de elétrons entre o óxido de grafeno e a molécula adsorvida na sua superfície (113). Desta forma o próprio filme de GO amplifica o sinal Raman das moléculas adsorvidas nele, mas como é mostrado na figura 53, esse aumento de sinal é muito pequeno quando comparado ao filme nanoestruturado com nanobastões de ouro.

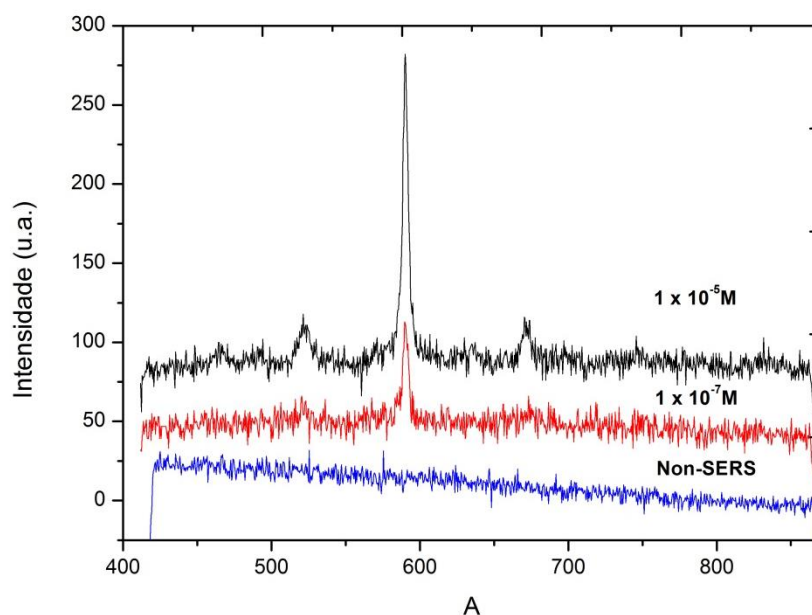


Figura 53 – Efeito SERS químico em filme de GO.

### 3.6.7 - Medidas SERS nos nanocompósitos de Nanotubos e Carbono e Nanobastões de ouro

Para medidas SERS nos nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro, 100  $\mu\text{L}$  de solução coloidal foram depositados sobre substratos de Si/SiO<sub>2</sub> previamente limpos e deixado para evaporação natural do solvente à temperatura ambiente. A evaporação do solvente concentra as nanopartículas em um anel. Este é o chamado efeito de “coffee ring” recentemente observado e aplicado para medidas de SERS (110), (111) e (112). Este processo é muito simples, rápido e altamente eficiente. A Figura 54 mostra resultados de microscopia eletrônica de varredura (MEV) onde podemos observar as imagens do “coffee ring” formado pela evaporação do solvente (água) com os nanocompósitos. Um zoom na borda do anel formado mostra que, com a evaporação, o nanomaterial forma um tipo de matriz 3D por emaranhamento dos nanotubos de carbono. Este processo é interessante porque cria várias regiões de hot spot, além de aumentar a superfície de absorção das moléculas.

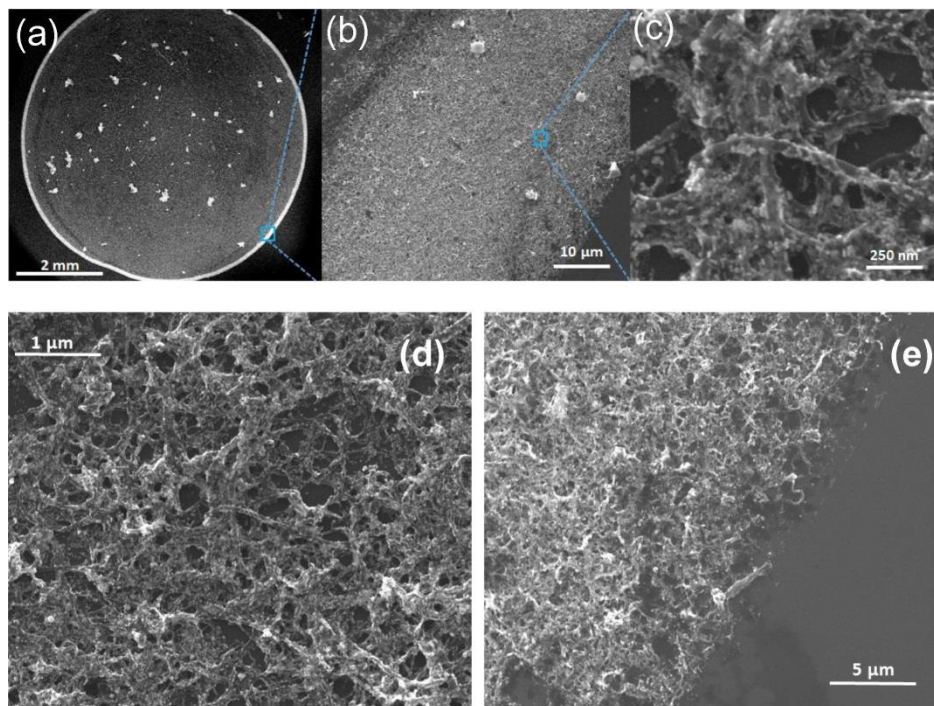


Figura 54 - Substrato formado por nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro.

Para as medidas SERS, os corantes aromáticos cresyl violeta (CV) e azul de metileno (MB) foram utilizados como moléculas modelo. As soluções de CV e MB são dissolvidas em etanol e depositadas sobre dois substratos, no vidro comum e no anel formado pelo material nanoestruturado. As medições Raman de moléculas puras, sem a condição SERS, foram realizadas em vidro. Os experimentos foram realizados utilizando um espectrômetro Raman T64000 Horiba e espectrômetro triplo Dilor XY. Os espectros de Raman no substrato SERS e no vidro foram registrados com 10 s e 60 s de acumulação, respectivamente, e os comprimentos de onda de excitação de 785 nm e 647 nm. O laser de excitação foi mantido em condições de baixa potência em (1 mW) e focada por uma objetiva de 10X nos nanocompósitos e 100X sobre o vidro.

A Figura 55 mostra os espectros de SERS para o CV medidos com comprimento de onda de 647 nm, a uma concentração de 1  $\mu\text{M}$ . O efeito SERS é claramente visto na borda do coffee ring formado pelo material nanoestruturado. Analisamos a sensibilidade de detecção deste substrato para a detecção do CV em várias concentrações para determinar o limite de detecção. A Figura 55b mostra o

espectro SERS do CV medido para um intervalo de concentração de  $10^{-3}$  M a  $10^{-10}$  M (0,1 nM). A intensidade do pico de  $591\text{ cm}^{-1}$  Raman SERS é representada para cada concentração. As mesmas medições foram realizadas com azul de metileno e os resultados são mostrados na Fig. 56, com comprimento de onda de 647 nm, a uma concentração de 0,1 pM e 1 nM.

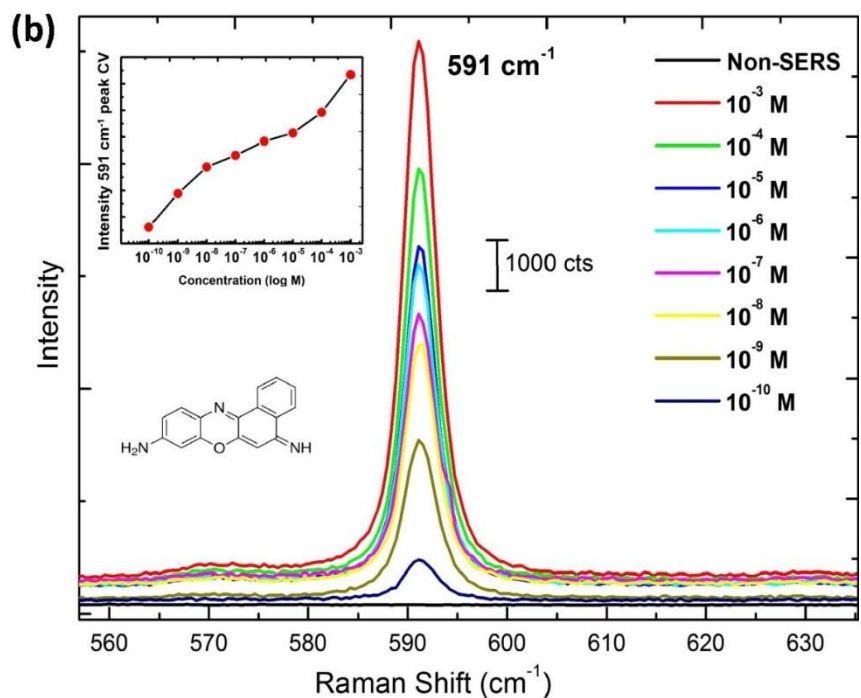
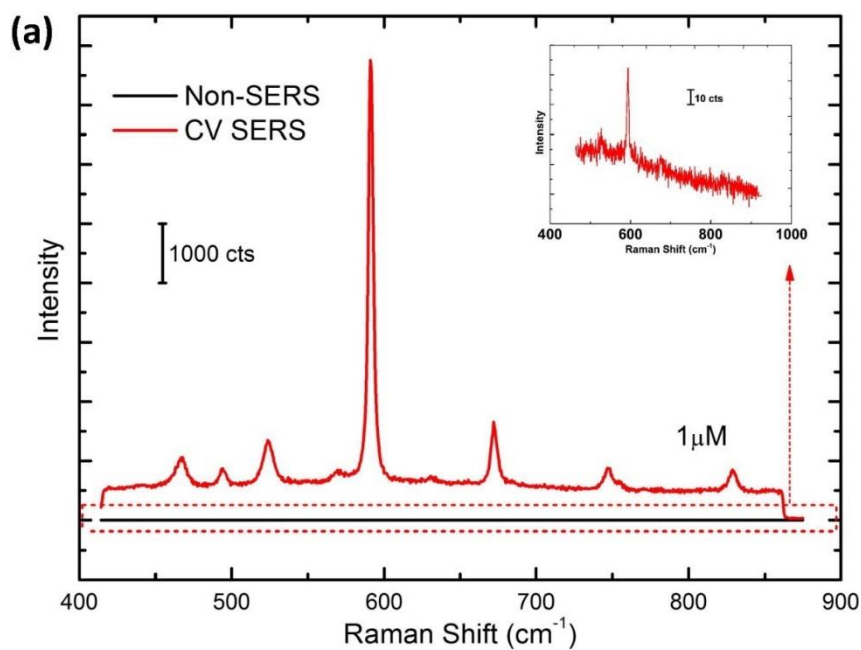


Figura 55 – (a) Medidas SERS sobre o substrato nanoestruturado formado por nanotubos de carbono e nanobastões de ouro, para a molécula de CV com 1  $\mu\text{M}$  de concentração. (b) Variação da intensidade do pico principal da molécula de CV com a concentração. (Inbox: Variação logarítmica da intensidade de sinal do pico principal com a concentração).

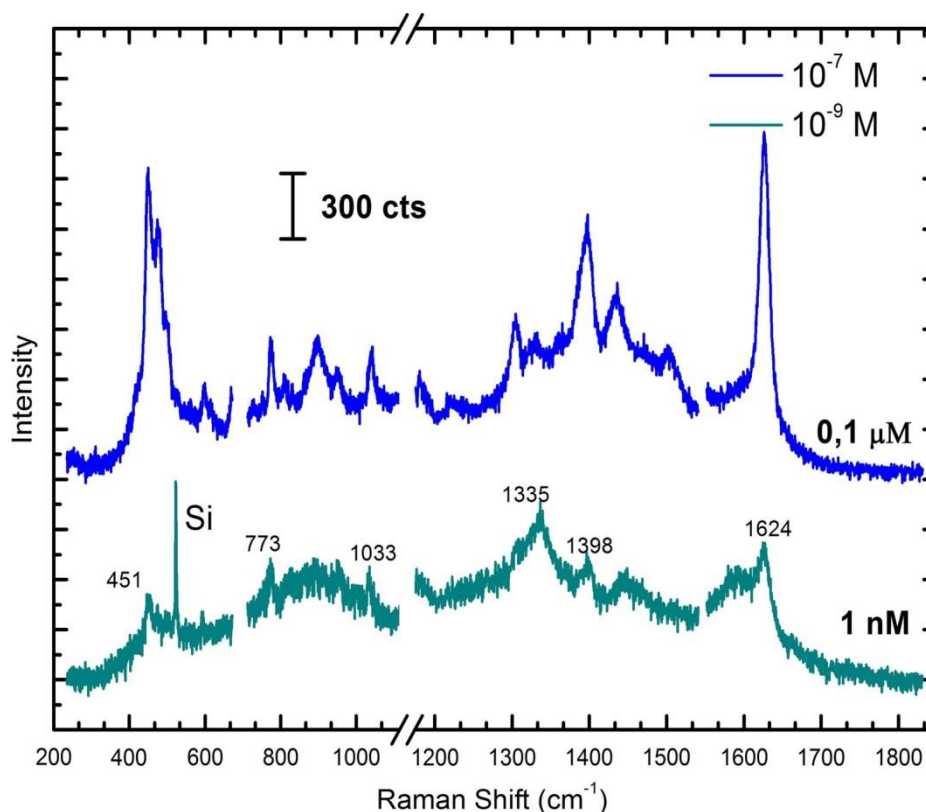


Figura 56 - Medidas SERS sobre o substrato nanoestruturado formado por nanotubos de carbono e nanobastões de ouro, para a molécula de MB.

Medidas com comprimento de onda de 647 nm, no anel formado pelo material nanoestruturado, mostra um forte aumento no sinal Raman dos corantes usados e, em ambos os casos, os limites de detecção na ordem de nanomolar foram observados mesmo com baixo tempo de acumulação. Isto é principalmente devido ao grande número de pontos de hot-spot e pelo tipo de matriz 3D formado pelo emaranhamento dos nanotubos de carbono, que é altamente vantajoso para capturar e concentrar as moléculas sob estudo. Medidas também foram efetuadas com laser na região do infravermelho próximo NIR (785 nm). Nanobastões de ouro são ideais para SERS nesta região espectral, porque suas bandas de absorção plasmon podem ser ajustáveis ao longo do espectro visível e do infravermelho próximo (NIR) através do controle de sua razão de aspecto. As medidas foram realizadas com os corantes CV e MB. A figura 57 mostra o espectro de SERS para o CV medido com comprimento de onda de 785 nm, a uma concentração de 1 μM. O espectro de Raman de substrato de vidro foi detectado com um sinal muito fraco.

Por outro lado, como mostrado na Fig. 57, sobre o “coffee ring” formado pelo material nanoestruturado, há um forte aumento do sinal Raman.

A Figura 57b mostra o espectro de SERS para a molécula de MB medido com comprimento de onda de 785 nm, a uma concentração de 1  $\mu\text{M}$ . O espectro de Raman no substrato de vidro foi detectado com um sinal muito fraco. Por outro lado, um forte sinal SERS é claramente observado na borda de “coffee ring” formado pelo material nanoestruturado. Medidas também foram realizadas com nanopartículas de ouro esféricas e nanobastões de ouro puros para comparar o desempenho com os nanocompósitos. A figura 58 mostra os espectros SERS comparando o desempenho de apenas nanobastões de ouro, nanopartículas de ouro esféricas e nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro, todos realizados sob as mesmas condições (647 nm, 1 mW e 10 s de acumulação). Nesta figura, vemos claramente que o substrato formado pelo material nanoestruturado tem um sinal Raman muito maior do que os outros materiais.

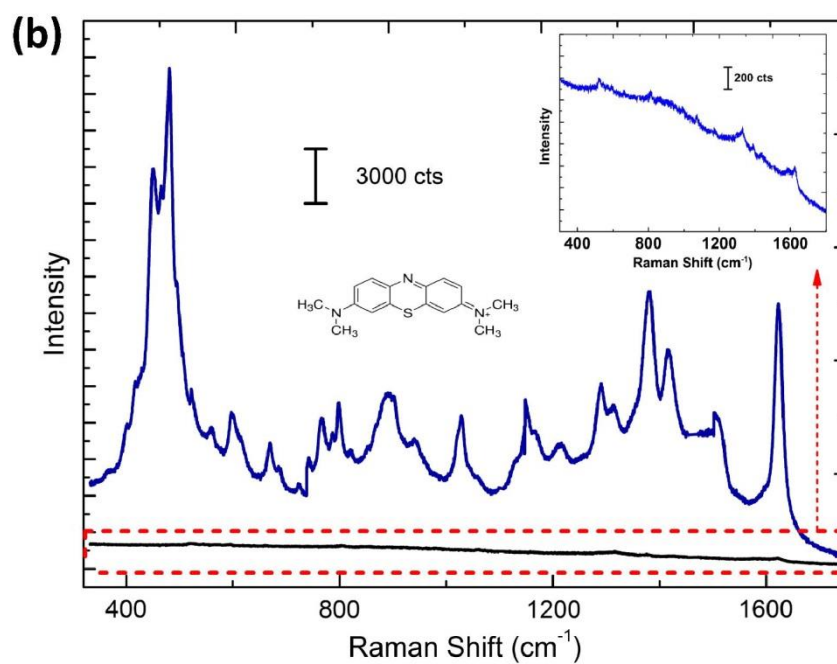
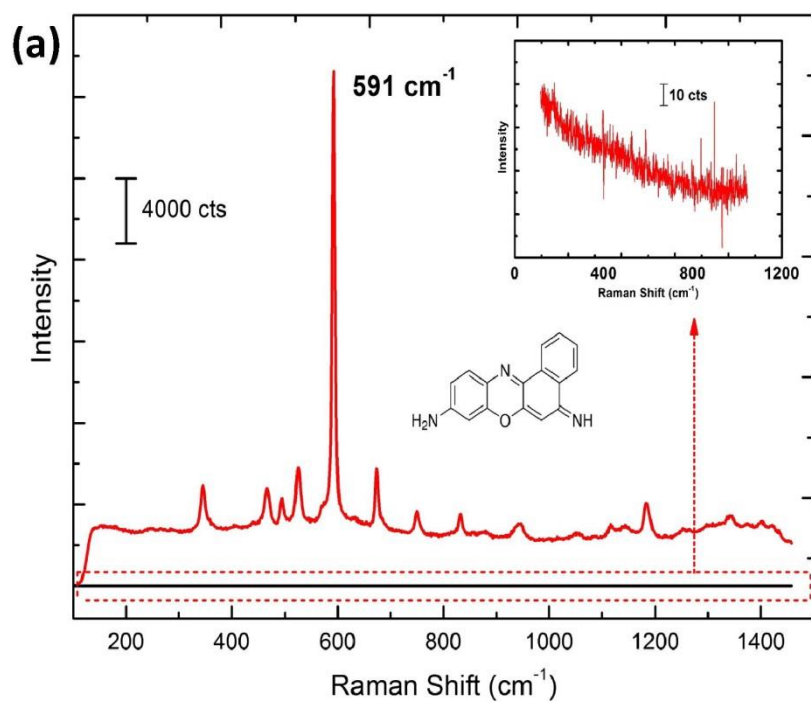


Figura 57 – (a) Espectro SERS para a molécula de CV medido com comprimento de onda de 785 nm, a uma concentração de 1  $\mu\text{M}$ , (b) espectro de SERS para a molécula de MB medido com comprimento de onda de 785 nm, a uma concentração

de 1  $\mu\text{M}$ . Em ambas as figuras o espectro preto representa o sinal Raman medido em substrato comum de vidro sem a demonstração do efeito SERS.

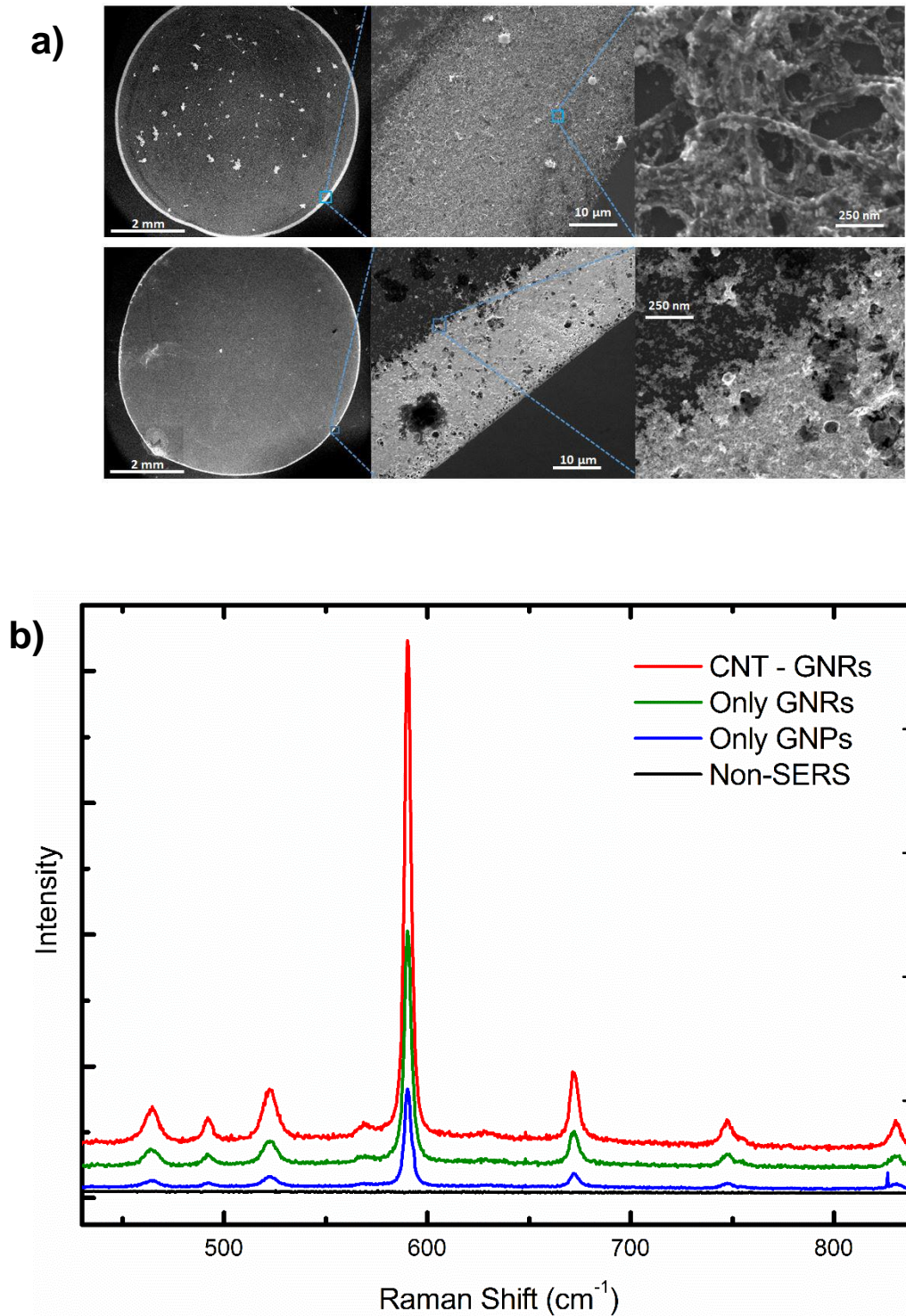


Figura 58 – (a) SEM do anel formado pelo material nanoestruturado e nanobastões de ouro puros. b) os espectros SERS de CV obtido a partir do anel formado pelo

material nanoestruturado (vermelho), nanobastões de ouro puro (verde) e nanopartículas de ouro esféricas (Azul).

# Parte Experimental

---

Espalhamento dinâmico de luz aplicado a biodeteção

**Na sessão 3,7 são apresentados os procedimentos e resultados das medidas de espalhamento dinâmico de luz - DLS.**

### **3.7 - Espalhamento dinâmico de luz aplicado à biodeteccção**

---

Os resultados desta sessão foram patenteados no INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial sob o número BR1020150298315 e o artigo “A simple biosensor based on rotational dynamics of gold nanorods” está em redacção.

**CAIRES, A. J; LADEIRA, L. O; JUNIOR, Ary Correa; SILVA, A.; LICINIO, P. Método e kit para deteccção de analitos em meio fluido com nanobastões metálicos através de espalhamento dinâmico de luz e usos. 2015 Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150298315 data de depósito: 27/11/2015. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.**

O método de espalhamento dinâmico de luz é frequentemente utilizado para determinação de tamanhos de partículas em vários tipos de sistemas coloidais. No caso de nanopartículas, esta técnica é especialmente interessante porque pode medir com grande precisão o tamanho de nanopartículas e determinar a existência de agregados na solução coloidal. Diversos autores têm reportado que algumas interações biológicas, por exemplo a interação entre antígeno e anticorpos, podem causar a agregação de várias nanopartículas metálicas esféricas de metais nobres, alterando assim o seu movimento de translação, o que é facilmente detectado por medição da dispersão de luz polarizada na solução coloidal. Este método tem sido utilizado com sucesso em vários trabalhos já publicados (114) (115) (116) (117). No entanto, este método tem a desvantagem de que interações múltiplas entre as partículas e agregados podem reduzir a especificidade e seletividade do método, já que qualquer situação que causa aglomeração será detectada pelo teste, e é bem conhecida a instabilidade coloidal de soluções de nanopartículas. Por outro lado, para nanopartículas metálicas anisotrópicas, tais como os nanobastões de ouro, a medida do espalhamento de luz despolarizada permite a medida da difusão rotacional. A forte dispersão de luz despolarizada dos nanobastões pode facilmente substituir qualquer outra dispersão de luz despolarizada de outras fontes na solução, tais como as biomoléculas e mesmo em amostras aglomeradas. Nanopartículas de ouro esféricas são incapazes de dispersar a luz despolarizada. Além disso, as alterações de difusividade translacionais variam com o inverso do tamanho de uma nanopartícula, já as mudanças de difusividade rotacionais variam em proporção ao

cubo do seu comprimento, fazendo deste método muito mais sensível. Assim, a ligação das biomoléculas aos nanobastões de ouro modifica consideravelmente o arrasto viscoso em seu movimento browniano dinâmico, o que aumenta a sua difusividade de rotação, desta forma a dinâmica rotacional dos nanobastões medida por espalhamento de luz despolarizada pode ser utilizada como método de detecção com grande sensibilidade.

O sinal depende apenas das nanopartículas anisotrópicas excluindo-se outras morfologias de nanopartículas, podendo assim serem utilizadas amostras polidispersas. Além disso, podem ser utilizados vários comprimentos de onda de excitação devido à banda de plasmon dos nanobastões de ouro ser variável com sua relação de aspecto. Neste trabalho, foi desenvolvido um sistema de detecção baseado na dinâmica rotacional de nanobastões de ouro em solução coloidal (Figura 59), para a detecção de antígenos e anticorpos por medidas de espalhamento dinâmico de luz despolarizada.

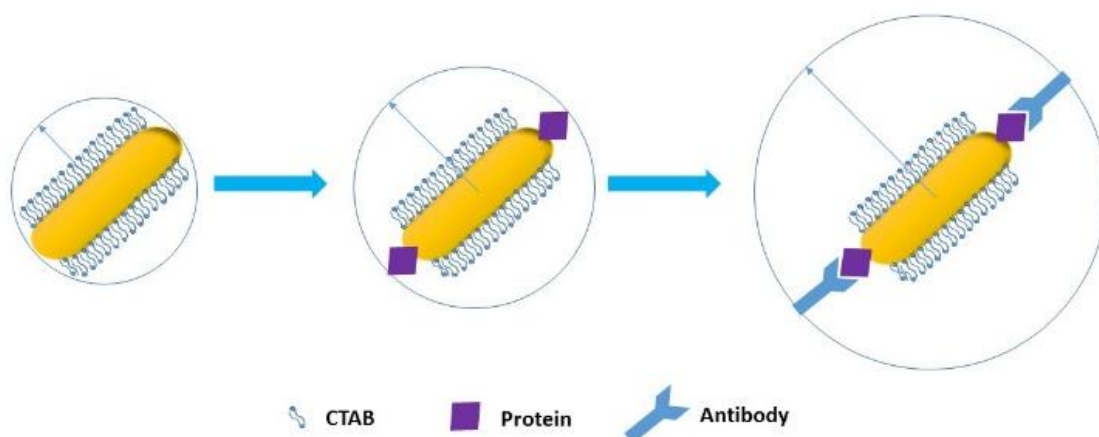


Figura 59 - Ilustração esquemática do processo de detecção. A interação biológica modifica o raio hidrodinâmico das nanobastões de ouro.

Nas nossas experiências, os nanobastões de ouro foram preparados pelo método de crescimento mediado por sementes, utilizando um processo um pouco diferente dos apresentados nos capítulos anteriores, já que para maximizar o estado de rotação dos nanobastões precisamos de partículas com comprimentos maiores. Assim a síntese foi realizada com o método recentemente publicado por Zubarev *et*

*al* (118) a partir da síntese de nanobastões de ouro de elevada relação de aspecto, usando hidroquinona como um agente redutor. Esta síntese utiliza como solução de crescimento ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>), brometo de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), ácido ascórbico e nitrato de prata. O crescimento dos nanobastões de ouro é iniciado pela adição de uma pequena quantidade de semente que são nanopartículas de ouro esféricas. A solução de sementes foi preparada pela mistura de 10 mL (0,1 M) de CTAB e 100 µL (0,1 M) de uma solução de HAuCl<sub>4</sub>. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de 0,01 M de NaBH<sub>4</sub>, com agitação durante 1 min. A mudança de cor solução de amarelo para marrom brilhante evidencia a formação de nanopartículas de ouro. A solução semente é mantida em 28 °C em banho térmico durante 1 h antes de ser utilizada. Prepara-se então a solução de crescimento misturando 100 mL (0,1 M) de CTAB e 1 mL (0,1 M) de AgNO<sub>3</sub> com 100 µL (0,1 M) de HAuCl<sub>4</sub> em um Béquer. Foram então adicionadas 500 mL (0,1 M) de solução aquosa de hidroquinona e a mistura foi agitada até sua cor se tornar clara. A cor da solução muda de amarela para transparente, indicando a redução do Au<sup>+3</sup> para Au<sup>+1</sup>. O passo final é a adição de 50 µL de solução semente na solução de crescimento. As sementes adicionadas atuam catalisando uma redução adicional do Au<sup>+1</sup> para Au<sup>0</sup> para formar nanobastões de ouro. A temperatura da solução de crescimento foi mantida constante a 30 °C. Os nanobastões de ouro sintetizados foram centrifugados três vezes a 5600 g durante 15 min para remover o excesso de CTAB.

Figura 60a-b mostra imagens de microscopia dos nanobastões de ouro sintetizados, e figura 60c mostra espectro de absorção de nanobastões de ouro em solução coloidal. Esta figura mostra os picos de ressonância de plasmon transversal e longitudinal em 520 nm e 932 nm, respectivamente. A Figura 60c mostra o histograma com a distribuição do tamanho das nanobastões de ouro. Para uso dos nanobastões de ouro em medidas de dispersão despolarizadas de luz para detecção de biomoléculas, os nanobastões sintetizados foram funcionalizados utilizando um método semelhante ao publicado por Jia-Yaw Chang *et al* (119). Neste método 10 mL de nanobastões de ouro sintetizados foram diluídos em 10 mL de água deionizada, em seguida são adicionados 200 µL (10 Mm) de ácido lipóico e sonificado durante uma hora. Neste processo, as moléculas de ácido lipóico são ligadas nas faces {111} das extremidades dos nanobastões, deixando grupos carboxila nestas

extremidades. A funcionalização é a ligação covalente entre o radical carboxila presente no ácido lipóico nas extremidades dos nanobastões de ouro através de ligações entre enxofre presentes nestes ácidos e o ouro. Esta ligação ocorre apenas nas extremidades, porque a superfície lateral dos nanobastões tem uma bicamada de CTAB originada do processo de síntese como relatado por outros autores (120).

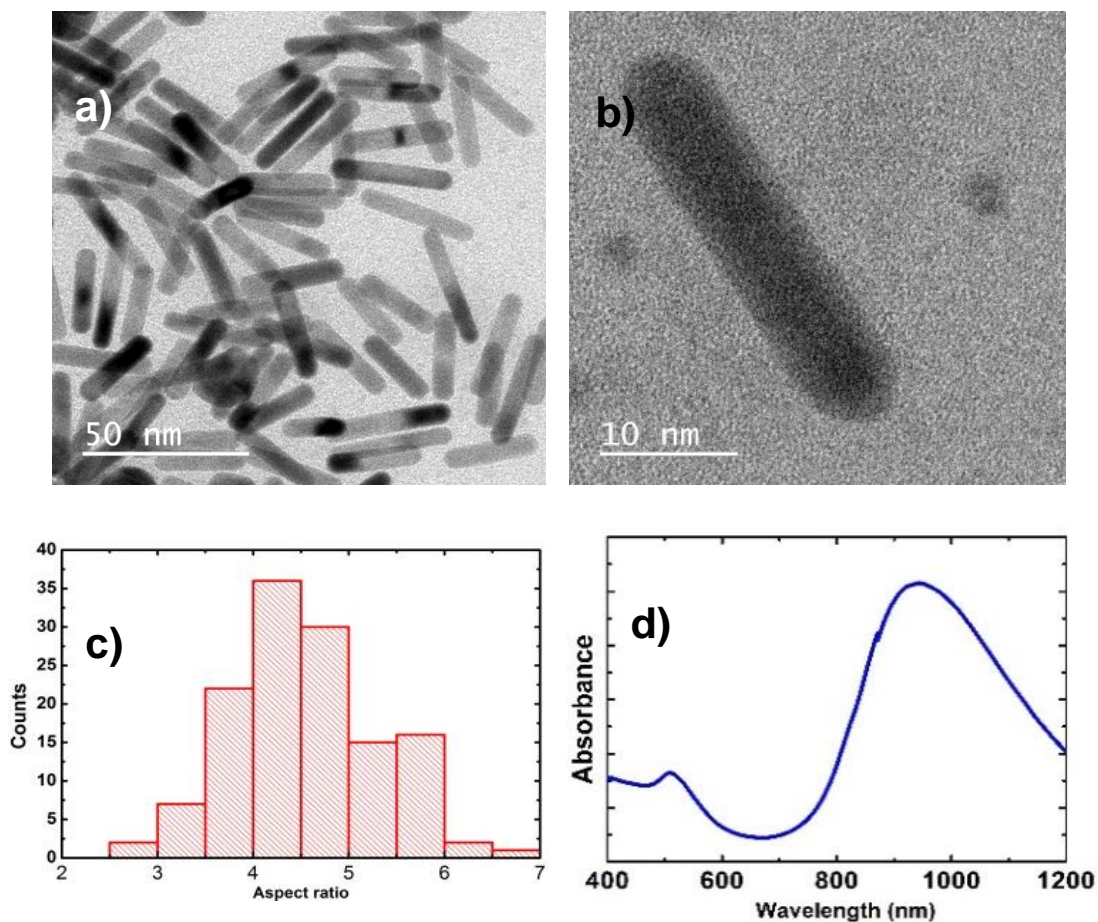


Figura 60 - (a) Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) dos nanobastões de ouro; (b) nanobastão isolado; (c) Histograma mostrando a distribuição do tamanho das nanobastões ouro; (d) Espectro de absorção dos nanobastões de ouro.

A ligação entre o grupo amina presente nas proteínas, anticorpos ou outras biomoléculas e as extremidades dos nanobastões de ouro foi realizada por reação de amidação ativada por diimida. Após a funcionalização dos nanobastões de ouro com ácido lipóico, a solução foi centrifugada para remover as moléculas de ácidos não ligadas e, em seguida, adicionou-se à solução 10 mL de EDAC / NHS (0,4 M:

0,1 M) e sonicou-se a 4 °C durante 30 minutos. Este procedimento é responsável por ativar o grupamento carboxílico presente no ácido lipóico. Este grupamento vai se tornar reativo para a ligação com aminas. Em seguida, as soluções ativas foram centrifugadas a 3600 RPM durante 10 minutos e dispersado em solução tampão fosfato PBS 1X. Estes nanobastões de ouro funcionalizados foram testados como veículo de detecção biológica. Os nanobastões previamente ativados foram conectados com a proteína BSA (albumina sérica bovina), a fim de testar se as medidas poderiam detectar proteínas. Em primeiro lugar, 1 mL (0,1 M) de BSA foi adicionado para 1 mL de nanobastões de ouro funcionalizados com 5 minutos de tempo de incubação. A seguir a solução foi filtrada por membrana Milipore (300 nm) para remover quaisquer agregados e proteínas reminiscentes na solução.

As medidas de dispersão dinâmica de luz despolarizada e polarizada foram realizadas utilizando um banho térmico a 30 °C para manter a solubilidade do CTAB. O aparelho utilizado foi um dispositivo de correlação de fótons Brookhaven BI9000 operando na configuração 90 ° de geometria de espalhamento com laser de comprimento de onda de 633 nm.

A Figura 61 mostra os resultados das medidas de dispersão de luz despolarizada com nanobastões de ouro ligados com a proteína BSA. Estas medidas foram realizadas com 5 minutos de tempo de incubação, e com 90 graus de ângulo de dispersão. Nesta figura, a linha preta é o resultado das medidas dos nanobastões de ouro como ativados anteriormente e a linha vermelha o resultado com a adição de 100 µL de BSA. A adição de proteína de BSA aumenta o raio hidrodinâmico dos nanobastões de ouro aumentando o tempo de decaimento característico do sistema. As medidas de dispersão de luz tanto polarizada quanto despolarizada podem facilmente detectar esta alteração na dinâmica coloidal. Esta técnica pode ser usada para estudar os diferentes tipos de interações entre proteínas e nanopartículas anisotrópicas, sendo uma melhoria sobre as técnicas que utilizam medidas dinâmicas tradicionais, como as publicadas por Liugi *et al* (121).

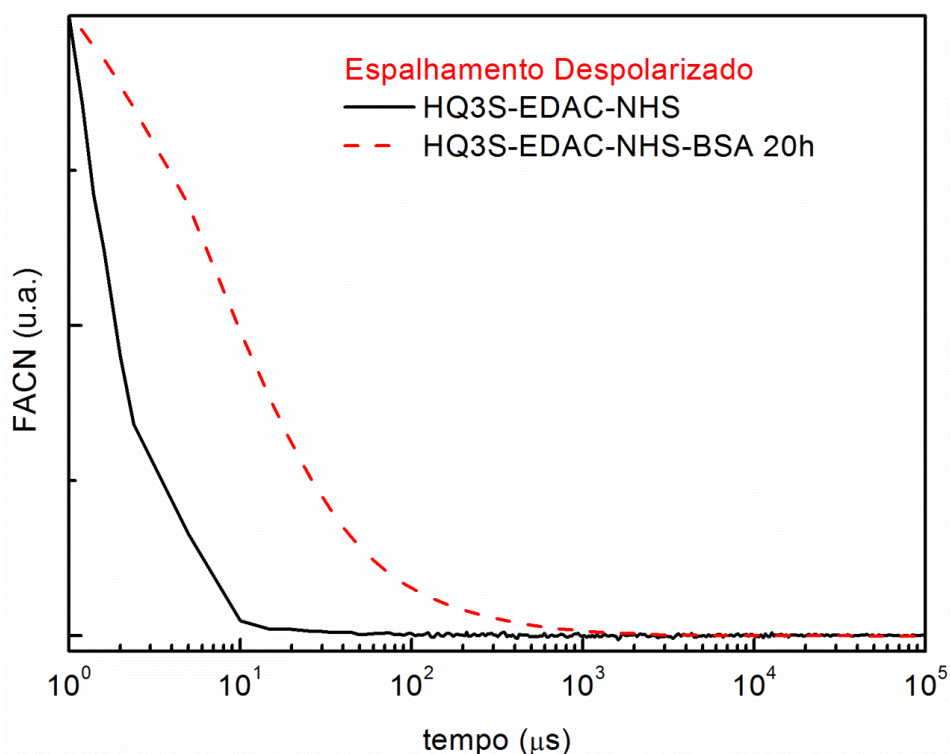


Figura 61 - Resultados das medições de dispersão de luz despolarizada com nanobastões de ouro ligados com a proteína BSA.

De modo a testar o mecanismo proposto como uma ferramenta de biodeteção, foi utilizada a ligação específica entre os anticorpos imunoglobulina E (IgE) e anti-IgE como uma plataforma modelo. Em primeiro lugar, 1  $\mu\text{L}$  (1 nM) de anticorpo IgE foi adicionado para 1 mL de nanobastões de ouro funcionalizados com 5 minutos de tempo de incubação, a seguir a solução foi filtrada por uma membrana Milipore (300 nm) para remover quaisquer agregados e anticorpos livres na solução, sendo que em seguida foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  (1 nM) de anticorpo anti-IgE. A Figura 62 mostra os resultados das medições de dispersão de luz despolarizada com nanobastões ligados com anticorpos IgE e a detecção de anticorpos anti-IgE como prova de conceito. Estas medidas foram realizadas com 5 minutos de tempo de incubação de IgE para nanobastões ativados e 10 minutos de tempo de incubação para o anti-IgE. As medidas são realizadas com 90 graus de ângulo de dispersão. Nesta figura, a linha preta é o resultado das medidas dos nanobastões de ouro ativos, em vermelho o resultado com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de anticorpos IgE. A adição de anticorpo IgE aumenta o raio hidrodinâmico dos nanobastões de ouro fazendo

aumentar o tempo de decaimento característico do sistema. As medidas de espalhamento de luz tanto polarizada como despolarizada podem facilmente detectar essa mudança na dinâmica coloidal. O resultado é a linha verde na Figura 62, a adição de anti-IgE é facilmente detectada por causa do aumento no tamanho hidrodinâmico dos nanobastões associado com o aumento de massa o que aumenta o tempo de relaxação característico do sistema como pode ser visto na Figura 62.

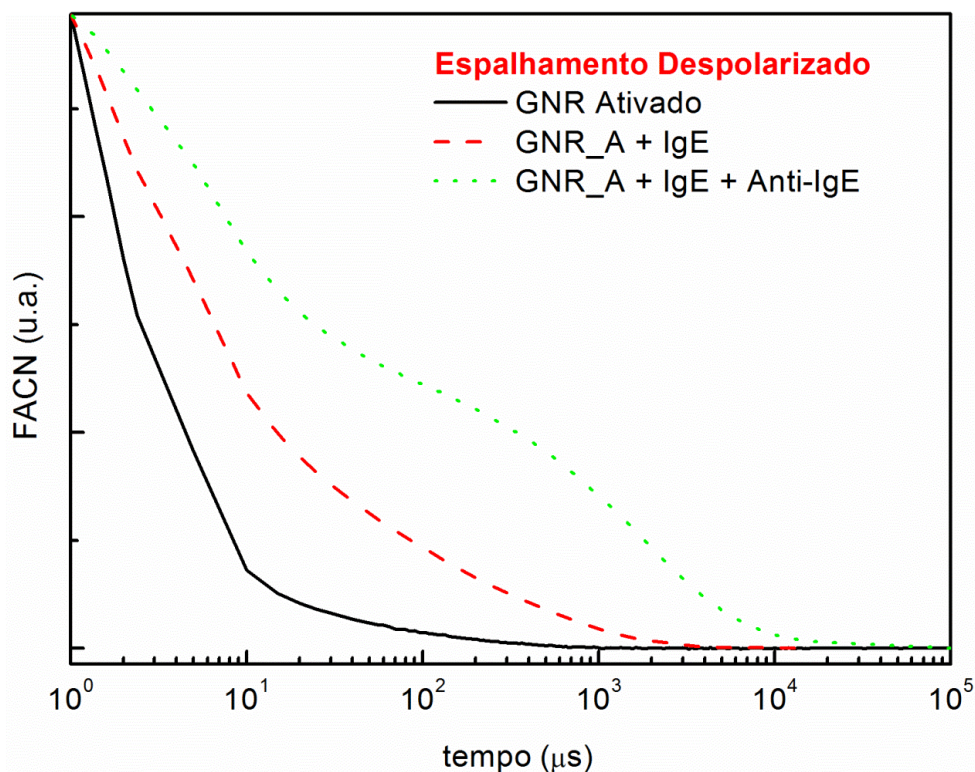


Figura 62 - Resultado das medidas de espalhamento de luz despolarizada de nanobastões de ouro puros e ligados com anticorpos imunoglobulina E (IgE) e anti-IgE.

Em resumo, foi desenvolvido um novo e simples método para a detecção de biomoléculas usando a dinâmica rotacional de nanobastões de ouro em solução coloidal por medidas de espalhamento dinâmico de luz despolarizada. Medições de dispersão dinâmica de luz despolarizada com nanobastões de ouro acoplados com a proteína BSA mostrou que este método pode ser aplicado para o estudo de proteínas e detecção pela dinâmica de rotação dos nanobastões de ouro. Além disso, relatamos como uma prova de conceito, a detecção de anticorpo anti-IgE por

meio de medições de dispersão de luz despolarizada de nanobastões anteriormente acoplados com o anticorpo IgE.

## 4 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvida a síntese de nanomateriais e nanocompósitos para aplicações em detecção química e biológica. Foi realizada a síntese de nanobastões de ouro por três diferentes metodologias, sendo demonstrada que a síntese pelo método de crescimento por sementes tradicional é o que demonstra melhores resultados em relação à qualidade e homogeneidade dos nanobastões sintetizados.

Foi desenvolvido um novo e simples método para a síntese de nanocompósitos entre nanomateriais de carbono (óxido de grafeno e nanotubos de carbono) com nanobastões de ouro. O processo foi realizado através da síntese de nanobastões de ouro sob irradiação de luz ultravioleta e o seu crescimento sobre os nanomateriais de carbono. O material sintetizado mostra uma excelente distribuição de nanobastões em solução aquosa como caracterizada por imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Estes materiais foram testados como eficientes substratos para medidas SERS de algumas moléculas modelo. Um filme fino foi formado com os nanocompósitos de óxido de grafeno e nanobastões de ouro, mostrando alta sensibilidade de detecção, preparação fácil e alta amplificação do sinal Raman. Mapeamento de sinal SERS neste filme mostrou grande uniformidade. Para os nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanobastões de ouro, foi desenvolvida uma metodologia alternativa para fabricação dos substratos SERS devido à dificuldade de formação de um filme uniforme. O material formado tem alta taxa de cobertura de nanobastões de ouro sobre os nanotubos de carbono com a formação de vários pontos hot spots, o que gerou enorme amplificação do sinal Raman via SERS, com detecção química na ordem de nanomolar de concentração.

Foi ainda desenvolvido um novo método para a detecção de biomoléculas usando a dinâmica rotacional de nanobastões de ouro em solução coloidal por medidas de espalhamento dinâmico de luz despolarizada. Medidas de dispersão de luz despolarizada com os nanobastões acoplados com proteína BSA mostrou que este método pode ser aplicado para o estudo de interações entre proteínas e

nanopartículas. Além disso, foi realizada uma prova de conceito para detecção de anticorpos anti-IgE, através medidas de espalhamento de luz despolarizada com nanobastões de ouro previamente acoplados com o anticorpo IgE.

# 5 - BIBLIOGRAFIA

1. *Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications*. Michael F. L. De Volder, Sameh H. Tawfick, Ray H. Baughman, A. John Hart. 6119, 2013, *Science*, Vol. 339, pp. 535-539.
2. *A roadmap for graphene*. K. S. Novoselov, V. I. Falko, L. Colombo, P. R. Gellert, M. G. Schwab, K. Kim. 7419, s.l. : *Nature*, 2012, *Nature*, Vol. 490, pp. 192–200.
3. *Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications*. Kian Ping Loh, Qiaoliang Bao, Goki eda, manish chhowalla. 12, s.l. : *Nature Chemistry*, 2010, *Nature chemistry*, Vol. 2, pp. 1015–1024.
4. *Gold nanorods and their plasmonic properties*. Huanjun Chen, Lei Shao, Qian Lia, Jianfang Wang. 7, 2013, *Chemical Society Reviews*, Vol. 42, pp. 2679-2724.
5. *Plasmon enhanced spectroscopy*. Aroca, Ricardo F. 2013, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 15, pp. 5355-5363.
6. *Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review*. Eleonora Petryayeva, Ulrich J. Krull. 1, 2011, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 706, pp. 8-24.
7. *Biosensing with plasmonic nanosensors*. Jeffrey N. Anker, W. Paige Hall, Olga Lyandres, Nilam C. Shah1, Jing Zhao & Richard P. Van Duyne. 6, 2008, Vol. 7, pp. 442-453.
8. *Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay*. S.D. Gan, K.R. Patel. 12, 2013, *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 133, pp. 1-3.
9. *Gold Nanoparticles for In Vitro Diagnostics*. Wen Zhou, Xia Gao, Dingbin Liu, Xiaoyuan Chen. 19, 2015, ZHOU, Wen et al. *Gold nanoparticles for in vitro diagnostics*. *Chemical Reviews*, Vol. 115, pp. 10575–10636.
10. *Diagnostic applications of Raman spectroscopy*. Qiang Tu, MS, Chang. 5, 2011, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Vol. 8, pp. 545-558.
11. Berne And Pecora, Bruce J. Berne, Robert Pecora. *Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Mineola, New York : Dover Publications, 2000.
12. *Recent progress in SERS biosensing*. Kyle C. Bantz, Audrey F. Meyer, Nathan J. Wittenberg, Hyungsoon Im, Özge Kurtuluş, Si Hoon Lee, Nathan C. Lindquist, Sang-Hyun Oh, Christy L. Haynes. 24, 2011, *Physical Chemistry Chemical Physics*, Vol. 13, pp. 11551-11567.
13. *SERS: Materials, applications, and the future*. Bhavya Sharma, Renee R. Frontiera, Anne-Isabelle Henry, Emilie Ringe, Richard P. Van Duyne. 1-2, *Materials Today*, Vol. 15, pp. 16-25.
14. *Review of Recent Progress of Plasmonic Materials and Nano-Structures for Surface-Enhanced Raman Scattering*. Alan X. Wang, Xianming Kong. 8 (6), 2015, *Materials*, pp. 3024-3052.

15. *A Collective Description of Electron Interactions. I. Magnetic Interactions.* Pines, David Bohm and David. 5, 1951, Phys. Rev., Vol. 82, pp. 625--634.
16. *Collective Energy Losses in Solids.* Pines, David. 3, 1956, Rev. Mod. Phys, Vol. 28, pp. 184-199.
17. *Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films.* Ritchie, R. H. 5, 1957, Phys. Rev., Vol. 106, pp. 874-881.
18. *Origin of the characteristic electron energy losses in aluminum.* Swan, C. J. Powell and J. B. 4, 1959, Phys. Rev., Vol. 115, pp. 869-875.
19. *Surface Plasma Oscillations of a Degenerate Electron Gas.* Ferrell, E. A. Stern and R. A. 1, 1960, Phys. Rev., Vol. 120, pp. 130-136.
20. *Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection.* Otto, A. 1968, Zeitschrift für Physik, Vol. 2016, pp. 398-410.
21. *Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light.* Kretschmann, E. Raether, H., 1968, Zeitschrift für Naturforschung A, Vol. 23 (12), pp. 2135-2136.
22. *Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing.* Katherine A. Willets, Richard P. Van Duyne. 2007, Annual Review of Physical Chemistry, Vol. 58, pp. 267-297.
23. Maier, Stefan Alexander. *Plasmonics: Fundamentals and Applications.* s.l. : Springer US, 2007. XXVI, 224 p..
24. *Theory of surface plasmons and surface-plasmon polaritons.* J M Pitarke, V M Silkin, E V Chulkov and P M Echenique. 2007, Rep. Prog. Phys., Vol. 70, pp. 1-87.
25. Craig F. Bohren, Donald R. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles.* New York : Wiley, 1998.
26. Novotny, Hecht. *Principles of Nano-Optics.* s.l. : Cambridge Univ. Press, 2006.
27. Huffman, C. F. Bohren and D. R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* . New York, USA : John Wiley & Sons, 1983.
28. *Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications.* Xiaohua Huang, Svetlana Neretina, Mostafa A. El-Sayed. 48, 2009, Advanced Materials, Vol. 21, pp. 4880-4910.
29. *A new type of secondary radiation.* Raman, C. V. and Krishnan, K. S. 1928, Nature, Vol. 121 (3048), pp. 501-502.
30. *Recent Advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy I.* Kiefer, W. 12, s.l. : Wiley Online Library, 2007, J. Raman Spectrosc, Vol. 38, pp. 1538–1553.
31. Kumar, Challa S.S.R. *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization.* [ed.] Challa S. S. R. Kumar. s.l. : Springer, 2012. 646.

32. Faria, Dra. Dalva L. A. de. Site do conselho Regional de quimica - IV Região. . [Online] 2016. [Cited: Janeiro 11, 2016.] [http://crq4.org.br/sms/files/file/Espectroscopia\\_Raman\\_4.pdf](http://crq4.org.br/sms/files/file/Espectroscopia_Raman_4.pdf).
33. *Raman spectroscopy of proteins: a review*. Rygula, A, Majzner, K, Marzec, K. M. Kaczor, A. Pilarczyk, M. Baranska, M. 8, 2013, *Journal of Raman Spectroscopy*, Vol. 44, pp. 1061-1076.
34. *Surface Raman Spectroelectrochemistry - Part I. Heterocyclic, Aromatic, and aliphatic adsorbed on the anodized silver electrode*. D.L. Jeanmaire, R.P. VanDuyne. 1977, *J. Electroanal. Chem.*, Vol. 84, pp. 1-20.
35. *Single-molecule surface enhanced Raman spectroscopy: a perspective on the current status*. Hae Mi Lee, Seung Min Jin, Hyung Min Kim, Yung Doug Suh. 2013, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 15, pp. 5276-5287.
36. *Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy*; Le Ru EC, Etchegoin PG. 2012, *Annual Review of Physical Chemistry*, Vol. 63, pp. 65-87.
37. *SERS Tags: Novel Optical Nanoprobes for Bioanalysis*. Yunqing Wang, Bing Yan, Lingxin Chen. 3, 2013, *Chemical Reviews*, Vol. 113, pp. 1391-1428.
38. *Medical applications of surface-enhanced Raman scattering*; Schlücker, Wei Xiea and Sebastian. 2013, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 15, pp. 5329-5344.
39. Otto, A. *Surface-Enhanced Raman Scattering: Classical and Chemical Origins*. Berlin : Springer-Verlag, 1984. p. 289.
40. *A Unified Approach to Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. John R. Lombardi, Ronald L. Birke. 14, 2008, *J. Phys. Chem. C*, Vol. 112, pp. 5605–5617.
41. *A Look at the Origin and Magnitude of the Chemical Contribution to the Enhancement Mechanism of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Theory and Experiment*. Nicholas Valley, Nathan Greeneltch, Richard P. Van Duyne, and George C. Schatz. 16, 2013, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, Vol. 4, pp. 2599-2604.
42. G. C. Schatz, M. A. Young, and R. P. Van Duyne. *Electromagnetic Mechanism of SERS*. [book auth.] K., Moskovits M., Kneipp, H. Kneipp. *In Topics in Applied Physics; Vol. 103: Surface Enhanced Raman Scattering Physics and Applications*. New York, pp.19-46 : Springer, 2006.
43. *Charge-transfer theory of surface enhanced Raman spectroscopy: Herzberg–Teller contributions*. John R. Lombardi, Ronald L. Birke, Tianhong Lu, Jia Xu. 1986, *The Journal of Chemical Physics*, Vol. 84, pp. 4174-4180.
44. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Investigations at the Nanorod Edges and Dimer*. Thomas, Jatish Kumar and K. George and Junctions. 6, 2011, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, Vol. 2, pp. 610-615.

45. *Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots*; Samuel L. Kleinman, Renee R. Frontiera, Anne-Isabelle Henry, Jon A. Dieringer and Richard P. Van Duyne. 2013, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 15, pp. 21-36.
46. *Mapping the SERS Efficiency and Hot-Spots Localization on Gold Film over Nanospheres Substrates*. Astilean, Cosmin Farcau, Simion. 27, 2010, *The Journal of Physical Chemistry C*, Vol. 114, pp. 11717-1172.
47. *Simple SERS substrates: powerful, portable, and full of potential*. J. F. Betz, W. W. Yu, Y. Cheng, M. White, G. W. Rubloff. 2014, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 16, pp. 2224-2239.
48. *High-performance SERS substrates: Advances and challenges*. B. Sharma, M. F. Cardinal, S. L. Kleinman, N. G. Greeneltch, R. R. Frontiera, M. G. Blaber, G. C. Schatz and R. P. Van Duyne. 8, 2013, *MRS Bulletin*, Vol. 38, pp. 615-624.
49. *An ink-jet printed, surface enhanced Raman scattering paper for food screening*. W. J. Liao, P. K. Roy, S. Chattopadhyay,. 2014, *RSC Advances*, Vol. 4, pp. 40487-40493.
50. *Large-area high-performance SERS substrates with deep controllable sub-10-nm gap structure fabricated by depositing Au film on the cicada wing*. Q. Jiwei, L. Yudong, Y. Ming, W. Qiang, C. Zongqiang, W. Wudeng, L. Wenqiang, Y. Xuanyi, X. Jingjun, S. Qian. 2013, *Nanoscale Res. Lett.*, Vol. 8, p. 437.
51. *Rapid fabrication of self-assembled interfacial film decorated filter paper as an excellent surface-enhanced Raman scattering substrate*. Wu-Li-Ji Hasi, Shuang Lin, Xiang Lin, Xiu-Tao Lou, Fang Yang, Dian-Yang Lin and Zhi-Wei Lu. 2014, *Analytical Methods*, Vol. 6, pp. 9547-9553.
52. *Off-Resonance Surface-Enhanced Raman Spectroscopy from Gold Nanorod Suspensions as a Function of Aspect Ratio: Not What We Thought*. S. T. Sivapalan, B. M. De Vetter, T. K. Yang, T. van Dijk, M. V. Schulmerich, P. S. Carney, R. Bhargava and C. J. Murphy, 2013, 7(3), 2099. 3, 2013, *ACS Nano*, Vol. 7, pp. 2099-2105.
53. *A Reproducible SERS Substrate Based on Electrostatically Assisted APTES-Functionalized Surface-Assembly of Gold Nanostars*. Q. Su, X. Ma, J. Dong, C. Jiang and W. Qian. 6, 2011, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, Vol. 3, pp. 1873–1879.
54. *Starfruit-Shaped Gold Nanorods and Nanowires: Synthesis and SERS Characterization*. L. Vigderman and E. R. Zubarev, , 2012, 28(24), 9034. 24, 2012, *Langmuir*, Vol. 28, pp. 9034–9040.
55. *Wikipedia - Dynamic light scattering*. [Online] [Cited: Janeiro 2016, 11.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic\\_light\\_scattering](https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering).
56. *Characterisation and determination of fullerenes: A critical review*. Alina Astefaneaia, Núñez O, Galceran MT. 2015, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 882, pp. 1-21.
57. *One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan*. Yunhua Yang, a Jianghu Cui, a Mingtao Zheng, b Chaofan Hu, Shaozao Tan, Yong Xiao, Qu Yanga, Yingliang Liu. 2012, *Chem. Commun*, Vol. 48, pp. 380-382.

58. *The properties and applications of nanodiamonds*. Vadym N. Mochalin, Olga Shenderova, Dean Ho, Yury Gogotsi. 2012, *Nature Nanotechnology*, Vol. 7, pp. 11-23.
59. "*C60: Buckminsterfullerene*". Kroto, H. W., et al. 6042, 1985, *Nature*, Vol. 318, pp. 162–163.
60. *Helical microtubules of graphitic carbon*. Iijima, Sumio. 1991, *Nature*, Vol. 354, pp. 56 - 58.
61. *Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter*. Sumio Iijima, Toshinari Ichihashi. 1993, *Nature*, Vol. 363, pp. 603 - 605.
62. *Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems*. Andrea C. Ferrari, Francesco Bonaccorso, Vladimir Fal'ko, Konstantin S. Novoselov, Stephan Roche, Peter Bøggild, Stefano Borini, Frank H. L. Koppens, Vincenzo Palermo, Nicola Pugno, José A. Garrido, Roman Sordan, Alberto Bianco, Laura Ballerini, Maurizio. 2015, *Nanoscale*, Vol. 7, pp. 4598-4810.
63. *Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene*. Lee C, Wei X, Kysar JW, Hone J. 5887, 2008, *Science*, Vol. 321, pp. 385-388.
64. *Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils*. Li X, Cai W, An J, Kim S, Nah J, Yang D. 5932, 2009, *Science*, Vol. 324, pp. 1312-1314 .
65. *Superior thermal conductivity of single-layer graphene*. Balandin AA, Ghosh S, Bao W, Calizo I, Teweldebrhan D, Miao F. 3, 2008, *Nano Lett*, Vol. 8, pp. 902-907.
66. *Graphene and GrapheneOxide: Synthesis, Properties, and Applications*. Zhu Y, Murali S, Cai W, Li X, Suk JW, Potts JR. 46, 2010, *Adv. Mater*, Vol. 22, pp. 3906–3924.
67. *Ultrathin graphite oxide–polyelectrolyte composites prepared by self-assembly: Transition between conductive and non-conductive states*. Kotov NA, Dékány I, Fendler JH. 8, 1996, *Adv Mater*, Vol. 8, pp. 637–641 .
68. *Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery*. Sun X, Liu Z, Welsher K, Robinson J, Goodwin A, Zaric S. 3, 2008, *Nano Res.* , Vol. 1, pp. 203-212.
69. *On the Atomic Weight of Graphite*. Brodie, B. C. 1859, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, Vol. 149, pp. 249-259.
70. *Verfahren zur darstellung der graphitsaure*. Staudenmaier, L. 1898, *Ber. Dtsch Chem. Ges.*, pp. 1781-1487.
71. *Preparation of graphitic oxide*. Hummers WS, Offeman RE. . 6, 1958, *J. Am. Chem. Soc*, Vol. 80, pp. 1339-1339.
72. *Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide*. Stankovich, S., Dikin, D.A., Piner, R.D., Kohlhaas, K.A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S.T., Ruoff, R.S. 7, 2007, *Carbon*, Vol. 45, pp. 1558–1565.

73. *Surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on gold nanorods: off-surface plasmon resonance condition*. B. Nikoobakht, J.P. Wang, M.A. El-Sayed. 1-2, 2002, *Chemical Physics Letters*, Vol. 366, pp. 17-23.
74. *Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method*. Nikoobakht, Babak and El-Sayed, Mostafa A. 2003, *Chemistry of Materials*, Vol. 15, pp. 1957-1962.
75. *Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template*. Jana, Nikhil R., Gearheart, Latha and Murphy, Catherine J. 18, 2001, *Advanced Materials*, Vol. 13, pp. 1389-1393.
76. *Photochemical Synthesis of Gold Nanorods*. Kim, Franklin, Song, Jae Hee and Yang, Peidong. 13, 2002, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 34, pp. 14316-14317.
77. *Gold Nanorods as Contrast Agents for Biological Imaging: Optical Properties, Surface Conjugation and Photothermal Effects*. Ling Tong, Qingshan Wei, Alexander Wei, Ji-Xin Cheng. 1, 2009, *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 85, pp. 21-32.
78. *Control of size and aspect ratio in hydroquinone-based synthesis of gold nanorods*. Carlo, MORASSO, et al. 2015, *Journal of Nanoparticle Research*, Vol. 17, p. 330.
79. *Two-Photon Luminescence of Gold Nanorods Mediated by Higher Order Plasmon Modes*. Niels Verellen, Denitza Denkova, Ben De Clercq, Alejandro V. Silhanek, Marcel Ameloot, Pol Van Dorpe, Victor V. Moshchalkov. 3, 2015, *ACS Photonics*, Vol. 2, pp. 410-416.
80. *Two-photon luminescence properties of gold nanorods*. T. Wang, D. Halaney, D. Ho, M. Feldman, T. Milner. 4, 2013, *Biomed. Opt. Express*, Vol. 4, pp. 585-595.
81. *Photothermal properties of gold nanorods and their application to five-dimensional optical recording*. Zijlstra, Peter. Centre for Micro-Photonics Faculty of Engineering and Industrial Sciences Swinburne University of Technology Melbourne, Australia : Tese de Doutorado, 2009.
82. *Photothermal Therapy Using Gold Nanorods and Near-Infrared Light in a Murine Melanoma Model Increases Survival and Decreases Tumor Volume*. Mary K. Popp, Imane Oubou, Colin Shepherd, Zachary Nager, Courtney Anderson, Len Pagliaro. 2014, *Journal of Nanomaterials*, Vol. 2014.
83. *Understanding the photothermal effect of gold nanostars and nanorods for biomedical applications*. Xiaocui Wang, Guohua Li, Yu Dingab, Shuqing Sun. 2014, *RSC Advances*, Vol. 4, pp. 30375-30383.
84. *Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review*. Jie Cao, Tong Sun, Kenneth T.V. Grattan. 2014, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 195, pp. 332-351.
85. Cui, Chen Gui and Da-xiang. *Functionalized Gold Nanorods for Tumor Imaging and Targeted Therapy*. *Cancer Biol Med*. 9 (4), 2012, Vols. 221–233.

86. Boseung Jang, Jin-Young Park, Ching-Hsuan Tung, In-Hoo Kim, Yongdoo Choi. Gold Nanorod–Photosensitizer Complex for Near-Infrared Fluorescence Imaging and Photodynamic/Photothermal Therapy In Vivo. *ACS Nano*. 5(2), 2011, Vols. 1086–1094.
87. Krishnan V. Chakravarthy, Adela C. Bonojud, William G. Davisb, Priya Ranjanb, Hong Dingd, Rui Hud, J. Bradford Bowzardb, Earl J. Bergeyd, Jacqueline M. Katz b, Paul R. Knighta, Suryaprakash Sambharab, Paras N. Prasadd. Gold nanorod delivery of an ssRNA immune activator inhibits pandemic H1N1 influenza viral replication. *PNAS*. 107 (22), 2010, Vols. 10172-10177.
88. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Investigations at the Nanorod Edges and Dimer Junctions*. Jatish Kumar, K. George Thomas. 6, 2011, *J. Phys. Chem. Lett*, Vol. 2, pp. 610–615.
89. *Quantum Plasmonics: Optical Properties and Tunability of Metallic Nanorods*. Jorge Zuloaga, Emil Prodan, Peter Nordlander. 9, 2010, *ACS Nano*, Vol. 4, pp. 5269–5276.
90. *Nanoscale spectroscopy with optical antennas*. Palash Bharadwaj, Ryan Beams, Lukas Novotny. 2011, *Chemical Science*, Vol. 2, pp. 136-140.
91. *Using aggregates of gold nanorods in SER(S) experiments: an empirical evaluation of some critical aspects*. Sudipto Pal, Laura E Depero, Ivano Alessandri. 42, 2010, *Nanotechnology*, Vol. 21.
92. Merhari, Lhadi. *Hybrid Nanocomposites for Nanotechnology, Electronic, Optical, Magnetic and Biomedical Applications*. New Delhi, India : Springer US, 2009. 978-0-387-72398-3.
93. *Synthesis of graphene-supported noble metal hybrid nanostructures and their applications as advanced electrocatalysts for fuel cells*. Chengzhou Zhua, Shaojun Dong. 2013, *Nanoscale*, Vol. 5, pp. 10765-10775.
94. *Prospects for graphene–nanoparticle-based hybrid sensors*. Perry T. Yin, Tae-Hyung Kim, Jeong-Woo Choic, Ki-Bum Lee. 2013, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 15, pp. 12785-12799.
95. *Critical Enhancement of Photothermal Effect by Integrated Nanocomposites of Gold Nanorods and Iron Oxide on Graphene Oxide*. Kum-Hee Yun, Sun-Hwa Seo, Bo-Mi Kim, Ara Joe, Hyo-Won Han, Jong-Young Kim, Eue-Soon Jang. 9, 2013, *Bulletin- Korean Chemical Society*, Vol. 14, p. 2795.
96. *Direct preparation of well-dispersed graphene/gold nanorod composites and their application in electrochemical sensors for determination of ractopamine*. Bai, Wanqiao, et al. 2014, *Electrochimica Acta*, Vol. 117, pp. 322-328.
97. *Facile green synthesis of graphene-Au nanorod nanoassembly for on-line extraction and sensitive stripping analysis of methyl parathion*. Zhu, Wenxin, et al. 2014, *Electrochimica Acta*, Vol. 146, pp. 419-428.
98. Brauer, G. *Handbook of Preparative Inorganic Chemistry, 2nd Ed*. New York : Academic Press, 1963.

99. Vivek Sharma, Kyoungweon Park, Mohan Srinivasarao. Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly. *Materials Science and Engineering R* . 65, 2009, Vols. 1-38.
100. *Improved Size-Tunable Synthesis of Monodisperse Gold Nanorods through the Use of Aromatic Additives*. Xingchen Ye, Linghua Jin, Humeyra Caglayan, Jun Chen, Guozhong Xing, Chen Zheng, Vicky Doan-Nguyen, Yijin Kang, Nader Engheta, Cherie R. Kagan, Christopher B. Murray. 3, 2012, *ACS Nano*, Vol. 6, pp. 2804-2817.
101. Daniela C. Marcano, Dmitry V. Kosynkin, Jacob M. Berlin , Alexander Sinitskii , Zhengzong Sun , Alexander Slesarev , Lawrence B. Alemany , Wei Lu and James M. Tour. Improved Synthesis of Graphene Oxide. . *ACS Nano*. 4 (8), 2010, Vols. 4806–4814.
102. Daniel R. Dreyer, Sungjin Park, Christopher W. Bielawski, Rodney S. Ruoff. The chemistry of graphene oxide. . *Chem. Soc. Rev.* 39, 2010, Vols. 228-240.
103. Tiziana Placido, Roberto Comparelli, Francesco Giannici, P. Davide Cozzoli, Giancarlo Capitani, Marinella Striccoli , Angela Agostiano, M. Lucia Curri. Photochemical Synthesis of Water-Soluble Gold Nanorods: The Role of Silver in Assisting Anisotropic Growth . *Chem. Mater.* . 21, 2009, Vols. 4192-4202.
104. Peng-Cheng Ma, Naveed A. Siddiqui, Gad Marom, Jang-Kyo Kim,. Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2010, Vol. 41, 1345–1367.
105. Dennis P. Strommen, Kazuo Nakamoto. Resonance raman spectroscopy. *J. Chem. Educ.* 54 (8), 1977, Vol. 475.
106. Weinan Leng, Anne Myers Kelley. Resonance Raman Intensity Analysis of Cresyl Violet. *Langmuir* . 19, 2003, Vols. 7049-7055.
107. *Vibrational spectroscopic studies on the dyes cresyl violet and coumarin 152*. E. Vogel, A. Gbureck, W. Kiefer. 2000, *Journal of Molecular Structure*, Vols. 550-551, pp. 177–190.
108. Gui-Na Xiao, Shi-Qing Man. Surface-enhanced Raman scattering of methylene blue adsorbed on cap-shaped silver nanoparticles. *Chemical Physics Letters*. 447, 2007, Vols. 305-309.
109. *Resonance Raman Cross-Sections and Vibronic Analysis of Rhodamine 6G from Broadband Stimulated Raman Spectroscopy*. Shim, S., Stuart, C. M. Mathies, R. A. 2008, *ChemPhysChem*, Vol. 9, pp. 697–699.
110. *Facile Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor Based on the Au Coffee Ring Effect*. J. Xu, J. Du, C. Jing, Y. Zhang, J. Cui. 2014, Vol. 6, pp. 6891-6897.
111. *Coffee-ring effect-based simultaneous SERS substrate fabrication and analyte enrichment for trace analysis*. W. Wang, Y. Yin, Z. Tana, Jingfu Liu. 2014, *Nanoscale*, Vol. 6, pp. 9588-9593.

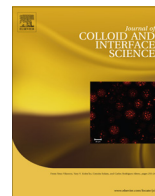
112. *Surface-enhanced Raman spectroscopy using a coffee-ring-type three-dimensional silver nanostructure*. R. Hara, T. Fukuoka, R. Takahashi, Y. Utsumi, A. Yamaguchi. 2014, RSC Advances, Vol. 5, pp. 1378-1384.
113. *Tuning Chemical Enhancement of SERS by Controlling the Chemical Reduction of Graphene Oxide Nanosheets*. Xinxin Yu, Hongbing Cai, Wenhua Zhang, Xinjing Li, Nan Pan, Yi Luo, Xiaoping Wang, J. G. Hou. 2, 2011, ACS Nano, Vol. 5, pp. 952–958.
114. *Dynamic Light Scattering as a Powerful Tool for Gold Nanoparticle Bioconjugation and Biomolecular Binding Studies*. Hilde Jans, Xiong Liu, Lauren Austin, Guido Maes, Qun Huo. 22, 2009, Anal. Chem., Vol. 81, pp. 9425–9432.
115. *A One-Step Homogeneous Immunoassay for Cancer Biomarker Detection Using Gold Nanoparticle Probes Coupled with Dynamic Light Scattering*. Xiong Liu, Qiu Dai, Lauren Austin, Janelle Coutts, Genevieve Knowles, Jianhua Zou, Hui Chen, and Qun Huo. 9, 2008, J. Am. Chem. Soc., Vol. 130, pp. 2780–2782.
116. *A washing-free and amplification-free one-step homogeneous assay for protein detection using gold nanoparticle probes and dynamic light scattering*. Liu X, Huo Q. 1-2, 2009, J Immunol Methods., Vol. 349, pp. 38-44.
117. *A One-Step Highly Sensitive Method for DNA Detection Using Dynamic Light Scattering*. Qiu Dai, Xiong Liu, Janelle Coutts, Lauren Austin, Qun Huo. 26, 2008, J. Am. Chem. Soc., Vol. 130, pp. 8138–8139.
118. *High-Yield Synthesis of Gold Nanorods with Longitudinal SPR Peak Greater than 1200 nm Using Hydroquinone as a Reducing Agent*. Leonid Vigderman, Eugene R. Zubarev. 2013, Chem. Mater., Vol. 25, pp. 1450-1457.
119. *Oriented assembly of Au nanorods using biorecognition system*. Jia-Yaw Chang, Huimeng Wu, Hui Chen, Yong-Chien Lingb, Weihong Tan. 2005, Chem. Commun., pp. 1092-1094.
120. *Structural Transition in the Surfactant Layer that Surrounds Gold Nanorods as Observed by Analytical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Seunghyun Lee, Lindsey J. E. Anderson, Courtney M. Payne, Jason H. Hafner. 24, 2011, Langmuir, Vol. 27, pp. 14748–14756.
121. *Tuning the interactions of PEG-coated gold nanorods with BSA and model proteins through insertion of amino or carboxylate groups*. Federica Scaletti, Alessandro Feis, Sonia Centi, Roberto Pini, Vincent M. Rotello, Luigi Messori. 2015, Journal of Inorganic Biochemistry, Vol. 150, pp. 120-125.
122. Schlücker, Wei Xie and Sebastian. Medical applications of surface-enhanced Raman scattering; *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 2013, 5329-5344.
123. LA, Falkovsky. Optical properties of graphene. *Journal of Physics: Conference Series* . 129, 2008, Vol. 012004.

124. Nikoobakht, Babak, Wang, Jianping and El-Sayed, Mostafa A. Surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on gold nanorods: off-surface plasmon resonance condition. *Chemical Physics Letters*. 3660(1,2), 2002, Vols. 17-23.

125. Yun, Kum-Hee, et al. Critical enhancement of photothermal effect by integrated nanocomposites of gold nanorods and iron oxide on graphene oxide. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 34 (9), 2013, Vols. 2795-2799.

126. *Surface chemistry of gold nanorods: origin of cell membrane damage and cytotoxicity*. Liming Wang, Xiumei Jiang, Yinglu Ji, Ru Bai, Yuliang Zhao, Xiaochun Wu, Chunying Chen. 2013, *Nanoscale*, Vol. 5, pp. 8384-8391.

# 6 - ANEXOS

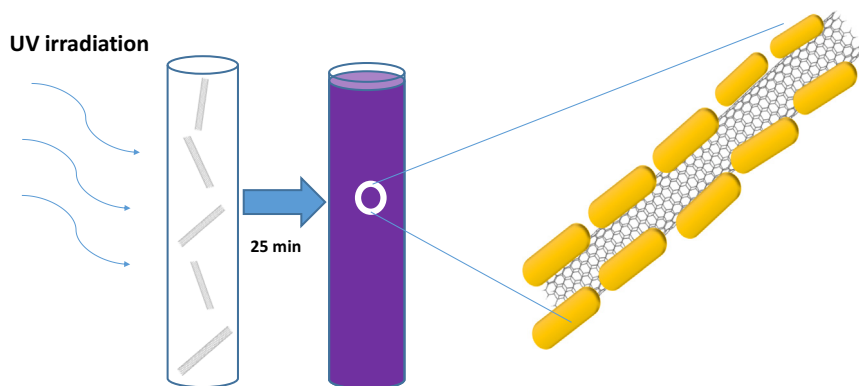


## Short Communication

## Highly sensitive and simple SERS substrate based on photochemically generated carbon nanotubes–gold nanorods hybrids

A.J. Caires<sup>a,\*</sup>, R.P. Vaz<sup>b</sup>, C. Fantini<sup>a</sup>, L.O. Ladeira<sup>a</sup><sup>a</sup> Nanomaterials Laboratory, Department of Physics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil<sup>b</sup> Department of Microbiology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 March 2015

Accepted 23 April 2015

Available online 27 May 2015

## Keywords:

Gold nanorods  
Carbon Nanotubes  
Hybrids  
Nanocomposite  
Photochemical  
SERS  
Coffee ring

## ABSTRACT

We report a simple and easy formation of hybrids between multi-wall carbon nanotubes and gold nanorods by one-pot *in situ* photochemical synthesis. Measurements of surface-enhanced Raman scattering (SERS) through the effect “coffee ring” in visible and near infrared (NIR) show high sensitivity with detection of nanomolar concentrations of aromatic dyes. The formation of nanocomposites between carbon nanotubes and gold nanorods without chemical binders simplifies the preparation. Photochemical synthesis is an advance over the techniques previously published.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

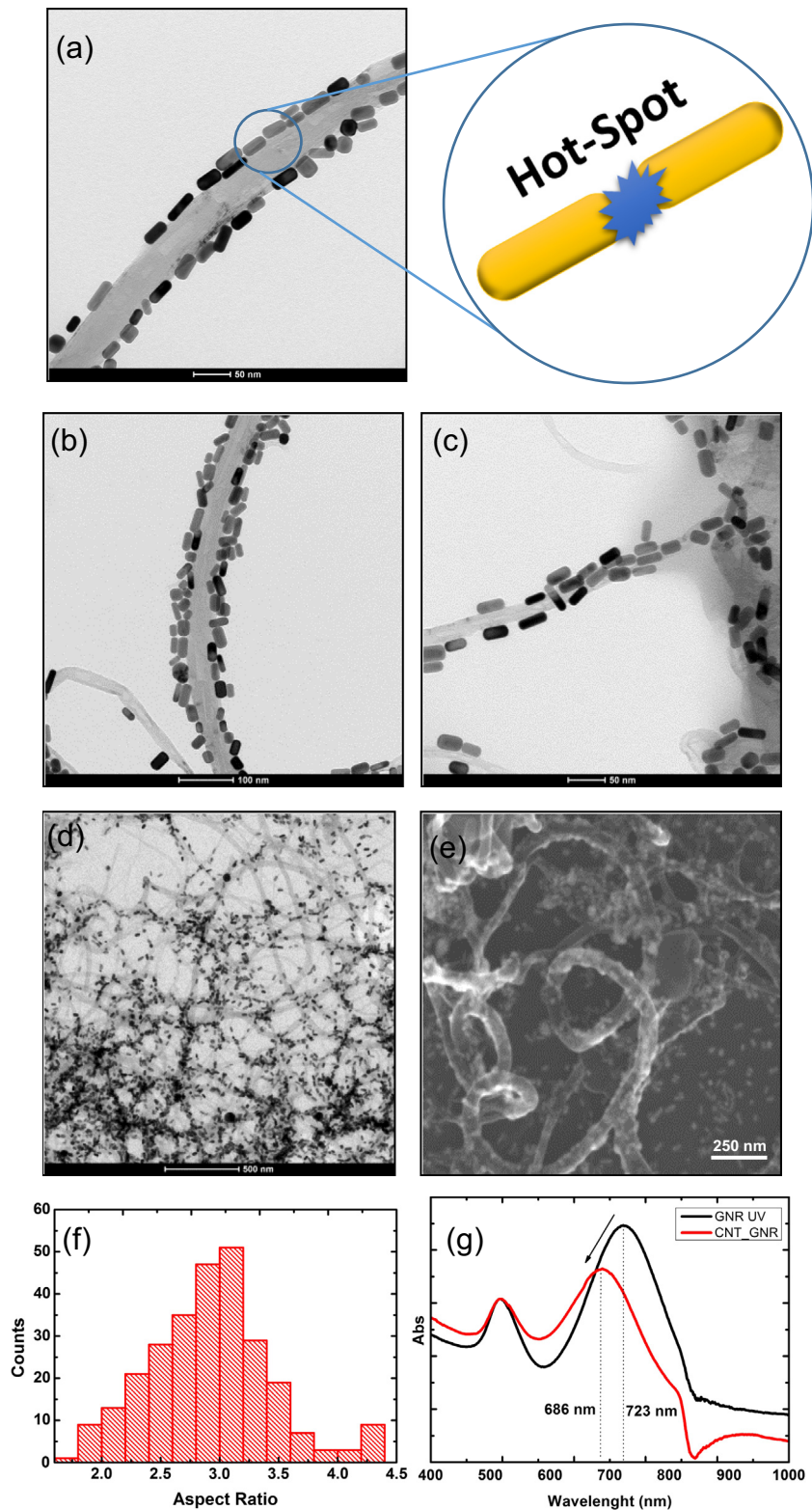
## 1. Introduction

Hybrid nanocomposites have attracted great attention in recent years by combining the physical and chemical properties of several nanomaterials to generate new properties and applications [1]. In particular, the combination of carbon nanomaterials with gold nanostructures is especially interesting because it combines the

**Abbreviations:** SERS, surface-enhanced Raman spectroscopy; MWCNT, multi-wall carbon nanotubes; GNR, gold nanorods; CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; MWCNT/GNR, multi-wall carbon nanotubes–gold nanorods hybrids; CV, cresyl violet; MB, methylene blue.

\* Corresponding author. Fax: +55 031 34095600.

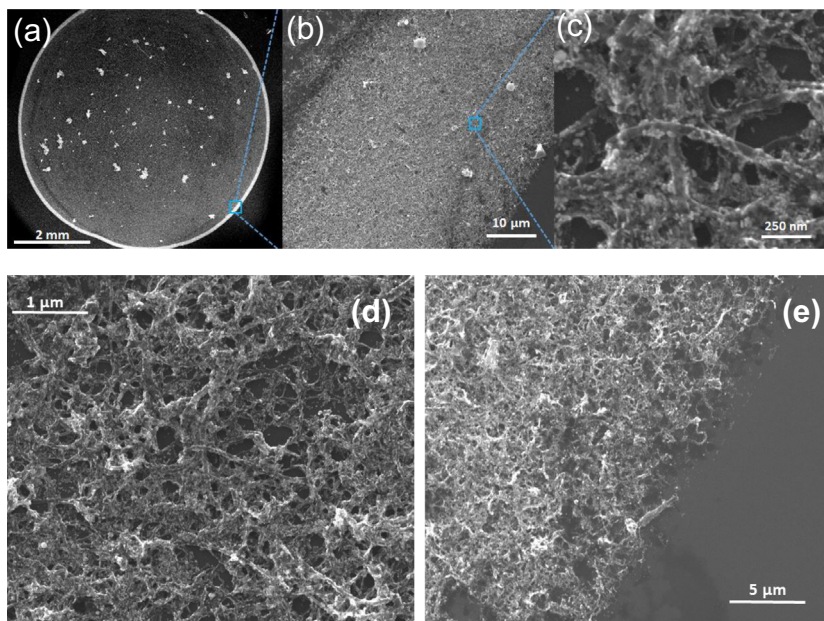
E-mail address: andersoncaires@outlook.com (A.J. Caires).



**Fig. 1.** (a) TEM showing hybrid MWCNT/GNR and Scheme showing hot spots created in the process, (b)–(d) TEM showing various MWCNT decorated with gold nanorods, (e) SEM image of MWCNT/GNR hybrids, (f) Statistical analysis of GNR aspect ratio, and (g) graph showing optical absorption spectra showing the plasmon peaks in the hybrid colloidal solution (in red) and nanorods synthesized without the presence of nanotubes and the same process (in black).

electromagnetic properties of gold nanoparticles of different shapes, with unique physical–chemical properties of carbon nanostructures such as graphene oxide and carbon nanotubes [2–4]. One of the most common applications for gold nanostructures is the formation of platform for surface-enhanced Raman

spectroscopy (SERS). The SERS effect consists of an enhancement of the Raman scattering signal by orders of magnitude of molecules attached to the gold nanoparticles due to the surface plasmon resonances. This effect has enormous attention in the last years because the possibilities of applications in chemical and biological



**Fig. 2.** SEM “coffee ring” effect in (a) coffee ring formed by the hybrid MWCNT/GNR, the points within the ring are aggregated of MWCNT/GNR, (b) zoom on the edge, in (c) zoom (showing off the edge with carbon nanotubes/gold nanorods hybrids). (d) and (e) Nanostructure hybrid MWCNT/GNR forms an array type 3D by entanglement of carbon nanotubes.

detection [5]. Among the types of gold nanoparticles, the gold nanorods are the most interesting for SERS applications due to the strong electric field around it at the resonance condition. In this condition, the nanorods are characterized as “nanoscale antennas” with large field enhancements due to its high curvature [6–8]. Thomas et al. showed that dimers of gold nanorods form regions of very high electric field (hot-spots) [9] between the nanorods cutting edges. El-Sayed et al. demonstrated that gold nanorods have larger increase in SERS signal than spherical nanoparticles [10]. Moreover, gold nanorods are better than spherical nanoparticles for use in SERS also because their plasmon absorption bands can be adjustable throughout the visible and near infrared (NIR) spectrum by controlling the nanorods aspect ratio.

Recently, the formation of hybrids between the gold nanorods and carbon nanostructures has been widely studied [11–15]. The main process used for the attachment of gold nanorods on carbon nanotubes is assisted by chemical bonding links [13–17]. In these processes, gold nanorods have to be separately synthesized and chemically functionalized with polymers or other binders to form covalent or non-covalent bonds with functionalized carbon nanotubes. In this communication, we report a simple, easy and one-pot *in situ* method of forming carbon nanotubes–gold nanorods hybrids by photochemical synthesis. Gold nanorods synthesized by ultraviolet light irradiation [18–20] grow in regions of the active chemical functionalized carbon nanotubes or are attached by electrostatic interactions. This method has the advantage of being fast, simple and performed in just one step. The photochemical synthesis is an advance in relation to the other techniques and the attachment of the gold nanorods without chemical linkage simplifies the preparation. The hybrids were applied to the development of SERS active substrates with high sensitivity by simple method of coffee-ring effect recently used for SERS studies [21–23].

## 2. Experimental

### 2.1. Synthesis MWCNT/GNR hybrids

The synthesis of hybrids between multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and gold nanorods (GNR) was performed by a

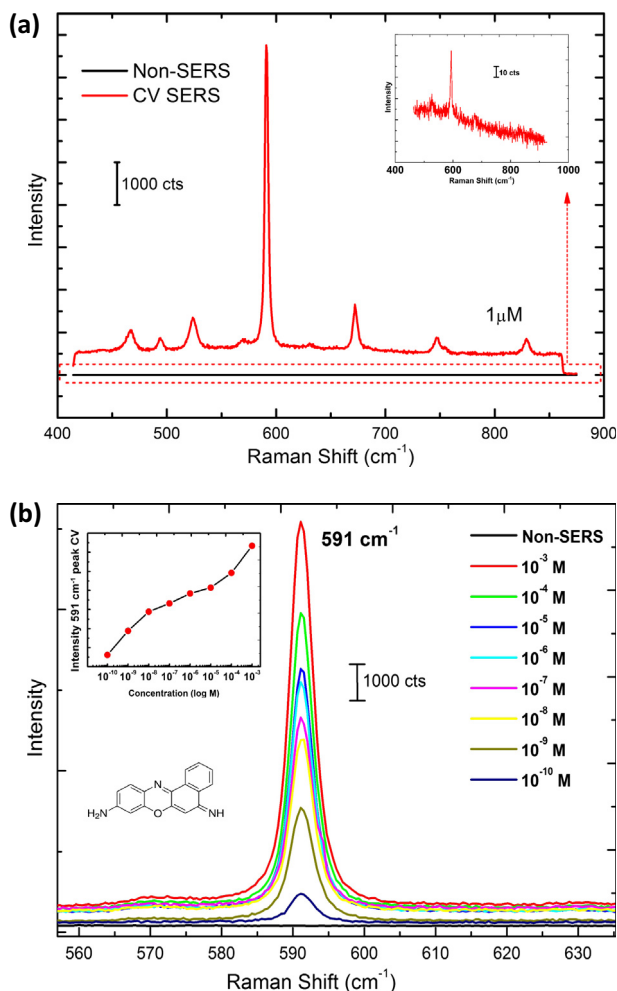
photochemical reaction upon irradiation of ultraviolet light. The synthesis process consist of a solution containing 15 mL (0.1 M) of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and 100  $\mu$ L (0.1 M) of tetrachloroauric acid ( $\text{HAuCl}_4$ ) solution as a precursor of gold. After that 1 mL (47 mM) of silver nitrate is add to the gold solution for inducing the growth of anisotropic gold nanorods. Then 100  $\mu$ L of a fresh prepared ascorbic acid at 0.1 M is add to the previous solution. Immediately the solution colour turned from yellow to colourless, indicating the reduction of Au (III) to Au (I). Afterwards, 400  $\mu$ L of cyclohexane and 330  $\mu$ L of acetone were added. The decomposition of the acetone by UV light irradiation produces ketyl radicals that reduce Au (I) to Au (0) forming Au seeds [24,25]. Finally, 5 ml (0.6 mg/mL) of the functionalized MWCNT is added to this solution and all components were then transferred to a quartz tube (1 m length, 2 cm diameter), and then placed under uniform UV light irradiation (8 W, 265 nm) for 25 min. The colloidal solution remained stable for several months. MWCNTs were functionalized by well-known chemical functionalization process [26]. Three rounds of centrifugation (5600 g for 10 min) were used to remove the CTAB from the solution. The hybrids of carbon nanotubes/gold nanorods were dispersed in deionised water 18.2 M $\Omega$ .

### 2.2. SERS Substrate

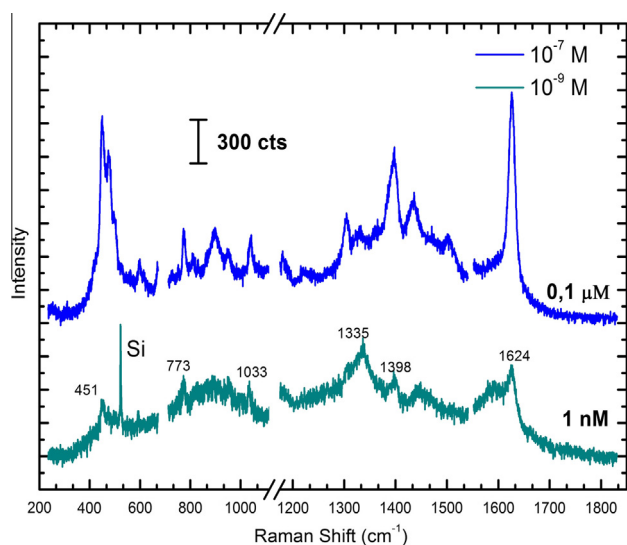
For SERS measurements, 100  $\mu$ L of colloidal solution of MWCNT/GNR hybrids were dropped on previously cleaned Si/SiO<sub>2</sub> substrates and dried at room temperature. The evaporation of the solvent concentrates the nanoparticles in a ring. This is the so called coffee-ring effect recently observed and applied for SERS measurements [21–23].

## 3. Results and discussion

The MWCNT/GNR hybrids was prepared by one-pot *in situ* photochemical synthesis. Fig. 1a and Fig. S1 (Supporting Material) shows transmission electron microscopy (TEM) images of the hybrid formed between multi-wall carbon nanotubes and gold nanorods. This synthesis process creates several hot-spots regions such as highlighted in Fig. 1a. It can be observed from Fig. 1b–d



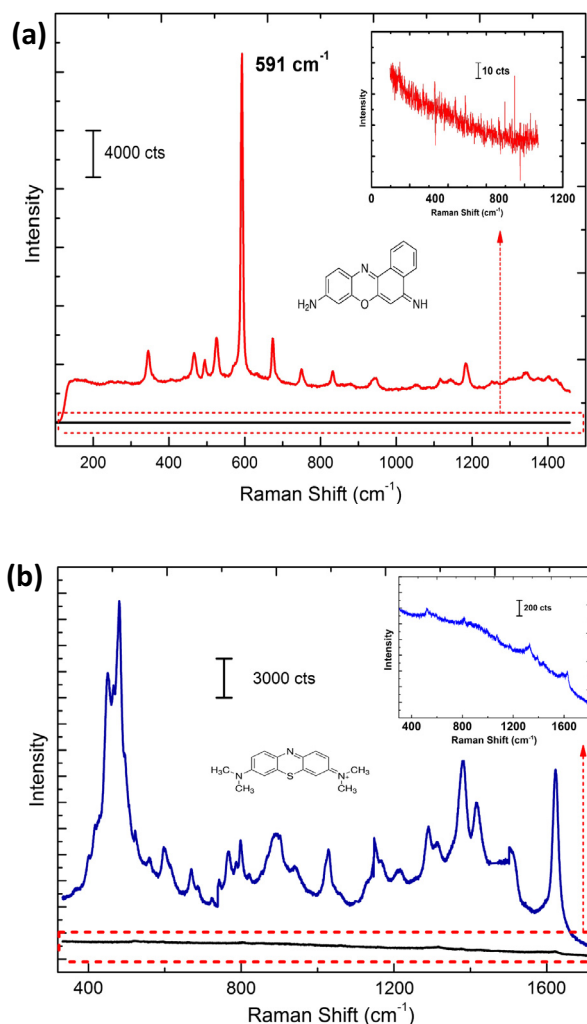
**Fig. 3.** (a) SERS spectrum of 1  $\mu\text{M}$  CV obtained from the coffee ring formed by the hybrid MWCNT/GNR. Inset: The Raman signal without SERS 10 $\times$ . (b) Plot of the intensity of the 591  $\text{cm}^{-1}$  CV SERS peak for various concentrations. Inset: Variations of CV SERS peak intensity at 591  $\text{cm}^{-1}$  as a function of logarithmic CV concentration.



**Fig. 4.** Measured SERS spectra of MB for a concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  and 1 nM. The Raman peak of silicon is seen at 520  $\text{cm}^{-1}$ .

that gold nanorods grow around all observed nanotubes, and consequently many hot spots are present in the hybrid. Fig. 1e shows scanning electron microscopy (SEM) image of MWCNT/GNR hybrids. The dimensions and aspect ratios of gold nanorods were evaluated by statistical analysis, which gives an average of aspect ratio around 3, as shown in Fig. 1f. The plasmon resonance of the MWCNT/GNR was measured by optical absorption spectroscopy in aqueous solution (Fig. 1g). This figure shows absorption peak due to plasmon resonance in colloidal hybrid solution (red curve) and nanorods synthesized without the presence of nanotubes and the same process (black curve). Gold nanorods spectrum presents absorption peaks centered at 514 and 723 nm corresponding respectively to the transversal and longitudinal plasmon modes. When the synthesis is carried out in the presence of MWCNT a damping and a blue-shift to 686 nm of the longitudinal peak were observed. This behaviour is due to the strong interaction between carbon nanotubes and gold nanorods.

The MWCNT/GNR hybrids were applied to a very simple, rapid and highly efficient SERS substrate. Fig. 2 shows scanning electron microscopy (SEM) images of the coffee-ring formed by the evaporation of the solvent (water) with the hybrid MWCNT/GNR. A zoom on the edge of ring formed shows that with the evaporation, the nanostructured hybrid MWCNT/GNR forms an array type 3D by



**Fig. 5.** (a) Measured SERS spectrum of CV (1  $\mu\text{M}$ ) on MWCNT/GNR hybrids with a wavelength of 785 nm showing a strong increase of the Raman signal. (b) Measured SERS spectrum of MB for a concentration of 1  $\mu\text{M}$  with a wavelength of 785 nm, showing a strong increase of the Raman signal.

entanglement of carbon nanotubes. This process is interesting because establishing several hot-spot regions besides increases the area of absorption of the probed molecules. This process is very simple and provides high enhancement factors for the Raman signal.

For SERS studies, the aromatic dye cresyl violet (CV) [27] and methylene blue (MB) [28] were used as SERS probe. The molecule CV has an intense peaks at  $591\text{ cm}^{-1}$  and methylene blue has two characteristic peaks around  $1624$  and  $445\text{ cm}^{-1}$  that are assigned to C–C and C–N–C stretching. The solutions of CV and MB are dissolved in ethanol and deposited on two substrates, in common glass and coffee-ring formed by MWCNT/GNR hybrids. The Raman measurements of pure molecules without the SERS condition were performed in glass. The experiments were performed using a Raman spectrometer T64000 Horiba and Dilor XY triple spectrometer. The Raman spectra on the MWCNT/GNR hybrids substrate and on the glass were recorded with 10 s and 60 s of accumulation, respectively, and excitation wavelengths of 785 nm and 647 nm. The excitation laser was kept at low power conditions at (1 mW) and focused by a  $10\times$  on the MWCNT/GNR hybrids substrate and  $100\times$  on the glass.

Measurements were taken with CV dye. Fig. 3a shows the CV SERS spectrum measured with wavelength of 647 nm at a concentration of  $1\text{ }\mu\text{M}$ . The SERS effect is clearly seen in the edge of the coffee-ring formed by MWCNT/GNR hybrids. We analysed the sensibility of MWCNT/GNR hybrids substrate to detection CV in several concentrations to determine the detection limit. Fig. 3b shows the measured CV SERS spectra for a concentration range from  $10^{-3}\text{ M}$  to  $10^{-10}\text{ M}$  (0.1 nM). The intensity of the  $591\text{ cm}^{-1}$  SERS Raman peak is plotted for each concentration.

The same measurements were taken with methylene blue and the results are shown in Fig. 4 with wavelength of 647 nm at a concentration of  $0.1\text{ }\mu\text{M}$  and 1 nM.

SERS measurements with laser wavelength of 647 nm in the ring formed by the hybrid edge shows a strong increase in the Raman signal of dyes used, and in both cases, nanomolar detection limits was achieved even with low accumulation time (10 s). This is mainly due to the large number of hot-spots and by the array type 3D formed by entanglement of carbon nanotubes which is highly advantageous to capture and concentrate the probe molecules.

SERS measurements were also carried out with laser in the near infrared region NIR (785 nm). Gold nanorods are ideal for SERS in this spectral region their plasmon absorption bands can be adjustable throughout the visible and near infrared (NIR) spectrum by controlling the nanorods aspect ratio. Measurements were taken with CV and MB dyes. Fig. 5a shows CV SERS spectrum measured with wavelength of 785 nm at a concentration of  $1\text{ }\mu\text{M}$ . The Raman spectrum in glass substrate was detected with a very weak signal. On the other hand, as shown in Fig. 5a, coffee-ring formed by MWCNT/GNR hybrids exhibited the strongest SERS intensity under NIR laser excitation.

Fig. 5b shows MB SERS spectrum measured with wavelength of 785 nm at a concentration of  $1\text{ }\mu\text{M}$ . The Raman spectrum in glass substrate was detected with a very weak signal. On the other hand, a strong SERS signal is clearly seen in edge of coffee-ring formed by MWCNT/GNR hybrids. SERS measurements were performed with gold nanoparticles and pure gold nanorods to compare the performance with MWCNT/GNR hybrids. Fig. S2 (Supporting Material) shows the SERS spectra comparing the performance of only gold nanorods, spherical gold nanoparticles and MWCNTs/GNR hybrids, all performed under the same conditions (647 nm, 1 mW and 10 s of accumulation). This figure we see clearly that the substrate formed by MWCNTs/GNR hybrids has a Raman enhancement signal much larger than the other materials.

## 4. Conclusions

In conclusion, we have demonstrated a very simple, rapid and highly efficient SERS sensor based on photochemically generated carbon nanotubes–gold nanorods hybrids nanocomposites. The multi-wall carbon nanotubes and gold nanorods hybrids have a large surface area which is highly advantageous for the trapping of target molecules. The hybrid formed have high coverage rate of aligned gold nanorods on the carbon nanotubes with the formations of several hot-spot points ensuring strong SERS enhancement. Measurements of surface-enhanced Raman scattering (SERS) through the effect “coffee ring”, in visible and near infrared show high sensitivity, for cresyl violet and methylene blue aromatic dyes, with a detection limit of nanomolar concentrations.

## Acknowledgments

This work was supported by CAPES, FAPEMIG, CNPq, and INCT/Nanomateriais de Carbono. The authors would like to acknowledge the Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.071>.

## References

- [1] L. Nicole, C. Laberty-Robert, L. Rozesabc, Clément Sanchez, *Nanoscale* 6 (2014) 6267–6292.
- [2] X. Huang, C. Tan, Z. Yin, H. Zhang, *Adv. Mater.* 26 (2014) 2185–2204.
- [3] X. Huang, X. Qi, F. Boey, H. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 666–686.
- [4] S. Li, X. Yu, G. Zhang, Y. Ma, J. Yao, B. Keita, N. Louisc, H. Zhao, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 2282–2287.
- [5] Y. Wang, B. Yan, L. Chen, *Chem. Rev.* 113 (3) (2013) 1391–1428.
- [6] B. Saute, R. Premasiri, L. Ziegler, R. Narayanan, *Analyst* 137 (2012) 5082–5087.
- [7] S.L. Smitha, K.G. Gopchandran, T.R. Ravindran, V.S. Prasad, *Nanotechnology* 22 (2011) 265705.
- [8] J. Zuloaga, E. Prodan, P. Nordlander, *ACS Nano* 4 (9) (2010) 5269–5276.
- [9] J. Kumar, K. Thomas, *J. Phys. Chem. Lett.* 2 (2011) 610–615.
- [10] B. Nikoobakht, J.P. Wang, M.A. El-Sayed, *Chem. Phys. Lett.* 366 (1) (2002) 17–23.
- [11] C. Hu, J. Rong, J. Cui, Y. Yang, L. Yang, Y. Wang, Y. Liu, *Carbon* 51 (2013) 255–264.
- [12] Y.K. Kim, H.K. Na, Y.W. Lee, H. Jang, S.W. Hanb, D.H. Min, *Chem. Commun.* 46 (2010) 3185–3187.
- [13] Deok-Jin Yu, D. Ganta, Elijah Dale, A.T. Rosenberger, James P. Wicksted, A. KaanKalkan, *J. Nanomater.* 2012 (2012) 154278.
- [14] L. Beqa, A.K. Singh, Z. Fan, D. Senapati, P.C. Ray, *Chem. Phys. Lett.* 512 (2011) 237–242.
- [15] Li Zhang, Shu Jun Zhen, You Sang, Jing Yun Li, Yi Wang, Lei Zhan, Li Peng, Jian Wang, Yuan Fang Lia, Cheng Zhi Huang, *Chem. Commun.* 46 (2010) 4303–4305.
- [16] M.A. Correa-Duarte, J. Pérez-Juste, A. Sánchez-Iglesias, M. Giersig, L.M. Liz-Marzán, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 4375–4378.
- [17] Miguel A. Correa-Duarte, Luis M. Liz-Marzán, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 22–25.
- [18] Kim, Jae Hee Song, P. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 14316–14317.
- [19] Marya Ahmed, Ravin Narain, *Langmuir* 26 (23) (2010) 18392–18399.
- [20] Gaser N. Abdelrasoul, Roberto Cingolani, Alberto Diaspro, Athanassia Athanassiou, Francesca Pignatelli, *J. Photochem. Photobiol. A* 275 (2014) 7–11.
- [21] J. Xu, J. Du, C. Jing, Y. Zhang, J. Cui, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 6891–6897.
- [22] W. Wang, Y. Yin, Z. Tana, Jingfu Liu, *Nanoscale* 6 (2014) 9588.
- [23] R. Hara, T. Fukuoaka, R. Takahashi, Y. Utsumi, A. Yamaguchi, *RSC Adv.* 5 (2014) 1378.
- [24] T. Placido, R. Comparelli, F. Giannici, P.D. Cozzoli, G. Capitani, M. Striccoli, A. Agostiano, M.L. Curri, *Chem. Mater.* 21 (2009) 4192–4202.
- [25] Marek Grzelczak, Luis M. Liz-Marzán, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 2089.
- [26] Peng-Cheng Ma, Naveed A. Siddiqui, Gad Marom, Jang-Kyo Kim, *Composites A* 41 (2010) 1345–1367.
- [27] E. Vogel, A. Gbureck, W. Kiefer, *J. Mol. Struct.* 550–551 (2000) 177–190.
- [28] G. Xiao, S. Man, *Chem. Phys. Lett.* 447 (2007) 305–309.

## PAPER

CrossMark  
click for updatesCite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 46552

# One-pot *in situ* photochemical synthesis of graphene oxide/gold nanorod nanocomposites for surface-enhanced Raman spectroscopy†

A. J. Caires,<sup>\*a</sup> D. C. B. Alves,<sup>ab</sup> C. Fantini,<sup>a</sup> A. S. Ferlauto<sup>a</sup> and L. O. Ladeira<sup>a</sup>

Nanoscale engineered plasmonic materials that can efficiently sustain surface enhanced Raman scattering (SERS) have been strongly pursued for high sensitivity molecular detection. In this work, we report the production of gold nanorod/graphene oxide (GNR/GO) nanocomposites by a simple, one-pot process whereby GNR are formed directly onto the GO flakes in solution by UV light irradiation. The proposed method is easily scalable and results in GNRs with low dispersion in size and aspect ratio of  $\sim 3$ . The GNR/GO hybrids were deposited in glass by filtration yielding homogenous films that were systematically tested as SERS active substrates. Raman spectroscopy mapping revealed that the tested substrates present spatially homogenous and reproducible SERS responses. Analysis of Raman spectroscopy by using a model molecule (cresyl violet perchlorate) indicates that the produced substrates can provide very large SERS enhancement factors ( $\sim 10^6$ ) and very low molecular detection limits ( $10^{-11}$  M).

Received 29th December 2014

Accepted 18th May 2015

DOI: 10.1039/c4ra17207h

[www.rsc.org/advances](http://www.rsc.org/advances)

## 1. Introduction

Plasmonic nanostructures have been a topic of intense research interest in recent years, mainly because of their excellent optical properties and many applications. This is due to the phenomenon of localized surface plasmon resonances (LSPRs) of noble metal nanoparticles which is associated with oscillations of electrons on the metal surfaces, inducing a resonant optical absorption. This SPR plasmon resonance phenomenon makes these metallic nanostructures behave as nanoantennas, amplifying the electromagnetic fields around the surface. This behavior leads to an important effect called surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) discovered by Richard Van Duyne in 1976.<sup>1</sup> This effect has been extensively studied since it opens the possibility of studying molecules at very low concentrations, which is interesting for applications such as biosensing.<sup>2</sup> The SERS effect originates from two principal mechanisms: the first is the charge exchange between the substrate and the molecule under study, and the other is the intense electromagnetic field originated by plasmon resonance around the metallic nanostructures.<sup>3,4</sup> The second one is most relevant in the gaps between two nanoparticles, called hot-spots, where the electric field is more intense and the highest enhancement is obtained.<sup>5</sup> Homogeneous and reproducible fabrication of SERS active

substrates is being widely studied.<sup>6,7</sup> Many substrates have been reported with different preparation methods<sup>8-10</sup> and metal nanostructures of several morphologies such as nanospheres,<sup>11</sup> nanorods,<sup>12</sup> nanostars<sup>13</sup> and nanostarfruit<sup>14</sup> have been used.

Gold nanorods<sup>15,16</sup> are excellent substrates for SERS due to strong electric field enhancements at their ends caused by their high curvature and because the easy tunability of the surface plasmon resonance in a wide spectral range in order to match the frequency of the excitation lasers. Many synthetic methods have been reported in recent years to obtain gold nanorods with high monodispersity, stability and homogeneity.<sup>17</sup> The seed-mediated method has been the most traditional since it was discovered by El-Sayed *et al.*<sup>18</sup> and Murphy *et al.*<sup>19</sup> The synthesis of gold nanorods mediated by ultraviolet irradiation, described by Yang *et al.*,<sup>20</sup> has the advantage of being faster and more easily scalable. Graphene oxide (GO)<sup>21</sup> and reduced graphene oxide (rGO)<sup>22</sup> are normally obtained by acid/base treatments. GO has abundant surface functional groups such as hydroxyl, carbonyl, and carboxyl, which are responsible for the high solubility in various solvents. This solubility makes this material a great candidate for the formation of hybrids with metallic nanostructures as recently reported by Dong *et al.* (2013)<sup>23</sup> and Yin *et al.* (2013).<sup>24</sup> The formation of hybrids between graphene oxide and gold nanorods have been reported by several authors, and the employed methods usually make use of linkers to promote electrostatic interaction of GO with gold nanorods.<sup>25-28</sup> Chaofan Hu *et al.*<sup>25</sup> have report the fabrication of graphene oxide/gold nanorod hybrid materials by electrostatic self-assembly and their application in SERS. In that method, gold nanorods were synthesized separately and interacted with graphene oxide, through polymers. Recently, Jayabal *et al.*<sup>27</sup>

<sup>a</sup>Department of Physics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil. E-mail: andersoncaires@outlook.com

<sup>b</sup>Physics Institute, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4ra17207h

reported a method for the preparation of reduced graphene oxide/gold nanorods embedded in an amine functionalized silicate sol-gel matrix. Dembereldorj *et al.*<sup>28</sup> have formed hybrids between gold nanorods and PEGylated-GO for photo-thermal cancer therapy. Other authors have used similar methods to form hybrids between gold nanorods and graphene oxide.<sup>29–34</sup>

In this article we report a simple one-pot *in situ* photo-chemical formation process of graphene oxide and gold nanorods hybrids by UV light irradiation. This method has the advantage of being fast, simple and performed in just one step. Furthermore, the GO/GNR hybrids were used to produce highly sensitive SERS substrate.

## 2. Experimental section

### 2.1 Chemicals and reagents

Tetrachloroauric acid ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ), ascorbic acid, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), acetone, cyclohexane,  $\text{NaNO}_3$  (99% purity),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95–98%),  $\text{KMnO}_4$  (99%),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and manganese oxide ( $\text{Mn}_2\text{O}_7$ ) were purchased from Sigma Aldrich. Graphite powder 99% purity was supplied by National de Graphite Ltda, Brazil. All solvents were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Milli-Q water with a resistivity of 18.2 M $\Omega$  cm was used. GO was synthesized using the modified Hummers method.<sup>35</sup>

### 2.2 Synthesis of graphene oxide/gold nanorods hybrid

First a 15 mL solution of CTAB (0.1 M) was prepared and 100  $\mu\text{L}$  of  $\text{HAuCl}_4$  (0.1 M) were added. The solution was stirred for 15 minutes. Next, in sequence, 1 mL (1 mM) of silver nitrate, 400  $\mu\text{L}$  cyclohexane, 330  $\mu\text{L}$  of acetone, and 100  $\mu\text{L}$  (0.1 M) of ascorbic acid were added. The solution changed from yellow to transparent, showing the reduction of  $\text{Au}^{+3}$  to  $\text{Au}^{+1}$ . The dispersion of GO (0.01 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) in water was assisted by sonication. Finally 5 ml of GO was added to the previous solution and the dispersion placed under UV-irradiation (256 nm, 30 W) for 25 minutes in a quartz tube. The final colloidal solution stayed stable for several months.

### 2.3 Characterization techniques

The optical characterization was carried out by UV-VIS-NIR using a Shimadzu UV 3600 spectrophotometer with 10 mm path length quartz cuvettes. TEM measurements were performed on a TEM TECNAI G2-20, using an accelerating voltage of 200 kV. Samples were prepared by drop-casting from the dispersion onto a TEM grid (200 mesh, holey carbon). Raman experiments were conducted using a Dilor XY triple spectrometer with different laser lines.

### 2.4 Substrate and SERS measurements

In order to prepare SERS substrates, excess CTAB was removed from the GNRs/GO solution through three rounds of centrifugation (5600 g for 10 min) and re-dispersion in deionized water (18.2 M $\Omega$ ). After which the solution of hybrid material was

filtered and washed with isopropanol several times using a 0.22 mm Millipore cellulose filter. The material collected in the filter was transferred to a glass substrate. The cellulose membrane/glass substrate was vacuum dried and then immersed in an acetone bath to remove the cellulose membrane. As a result, a thin film of the hybrid GNR/GO material was formed.

Cresyl violet perchlorate (CV) dye was used as model molecule for SERS measurements. CV was diluted in pure ethanol at different concentrations. The CV solution was either dropped on to the GNR/GO substrate film (for standard SERS measurement) or the substrate was dipped into this solution for 20 seconds and dried at room temperature (for SERS mapping). The surface enhanced Raman spectra were recorded with the 647 nm wavelength excitation with one 10 seconds accumulation. SERS measurements were also performed with wavelength lasers 488 nm, 514 nm and 568 nm. The laser power on the sample was kept low at 1 mW, focused in by an objective 10 $\times$ . The reference Raman spectrum measured in a standard glass substrate was performed with 647 nm excitation wavelength with 60 seconds accumulation and focused in by an objective 100 $\times$ . A SERS Mapping was performed on Raman Microscope alpha 30R (Witec), with 633 nm excitation wavelengths with 0.3 seconds accumulation. The laser power on the sample was kept low at 1 mW focused in by an objective 10 $\times$ .

## 3. Results and discussion

The synthesis process of GNRs/GO hybrids was carried out by photochemical reduction of Au ions in presence of GO, under irradiation of ultraviolet light. The photochemical reactions promote the growth of gold nanorods onto graphene oxide sheets *in situ*. However, a specific environment has to be setup by a solution containing CTAB as surfactant,  $\text{HAuCl}_4$  as precursor of gold, silver nitrate which acts in the induction of anisotropic growth of gold nanorods, similar to the one demonstrated by Placido *et al.*<sup>36</sup> Cyclohexane promotes the formation of micelle templates that assist the anisotropic growth, ascorbic acid promotes the reduction of  $\text{Au}^{+3}$  to  $\text{Au}^{+1}$ , a first reduction of the gold precursor, and acetone generates ketyl radicals that promote the reduction of gold  $\text{Au}^{+1}$  to  $\text{Au}^0$ , being considered as the radical initiator.<sup>37,38</sup> Silver nitrate and acetone are critical for the photochemical synthesis of GNR/GO hybrids. There is no growth of gold nanorods without their presence and, without irradiation by ultraviolet light, there is no formation of any type of nanoparticles. After this process, a solution of GNRs/GO hybrid material in CTAB is obtained. The transmission electron microscopy (TEM) images (Fig. 1 and S1 in ESI<sup>†</sup>) show the GNRs/GO hybrid material obtained by photochemical synthesis. In Fig. 1a–c, the gold nanorods were supported in graphene oxide sheets, as schematically shown in Fig. 1e. Fig. 1a–c shows clearly a large number of gold nanorods efficiently dispersed on graphene oxide sheets. The dimensions and aspect ratio of the gold nanorods were evaluated by statistical analysis, showing an average aspect ratio of 3 (30 nm/10 nm), as shown in Fig. 1d.

The plasmon resonance of the GNRs/GO in aqueous solution was measured by optical absorption. Fig. 2 shows the optical

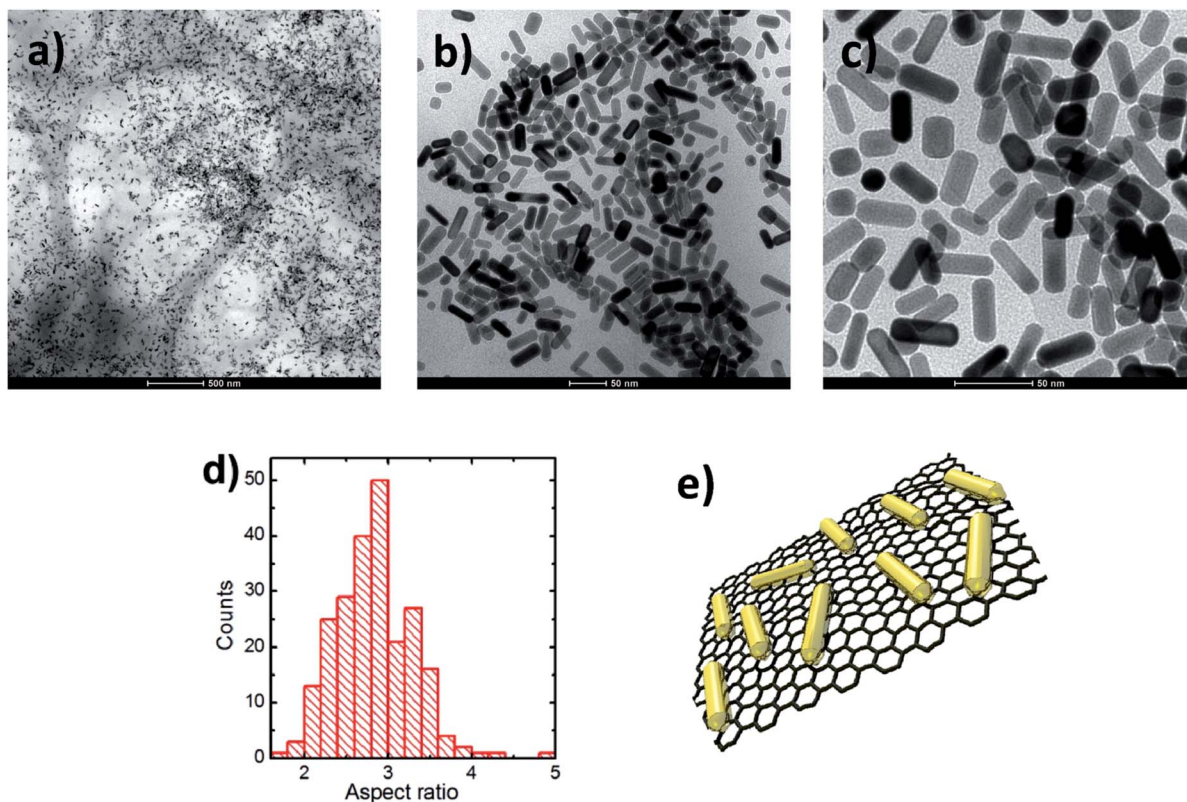


Fig. 1 (a–c) TEM images of hybrid GNR/GO at different magnifications. (d) Aspect ratio statistical distribution (e) schematic representation of the hybrid GNR/GO. (Note: TEM images were made using holey carbon microscopy grid).

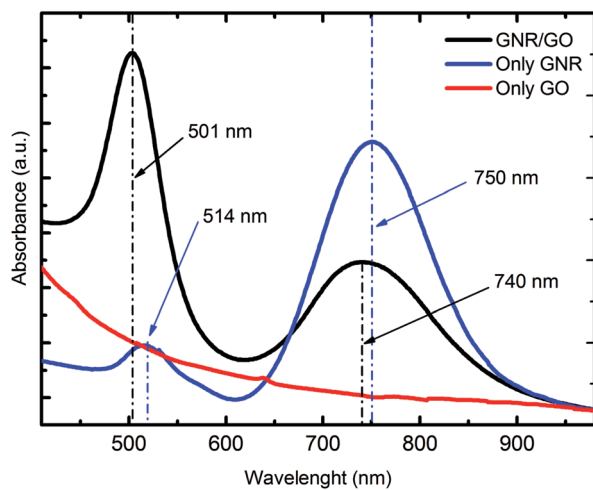


Fig. 2 Optical absorption spectra of GO (red line), pure gold nanorods (blue line) and hybrid of gold nanorods/graphene oxide (black line).

absorption spectra of GO (red line), GNRs (blue line) and GNRs/GO (black line). The GNRs were synthesized by the same process described previously but without the presence of GO. The spectrum presents two absorption bands centered at 514 and 750 nm corresponding to the transversal and longitudinal plasmon modes respectively. When the synthesis was carried out in the presence of GO, an increase of the transverse peak

was observed. The longitudinal resonance peak is shifted to 740 nm when the nanorods were allocated onto GO. The longitudinal plasmon damping and transverse peak increase are related to the strong interaction of the lateral surface of the gold nanorods with graphene oxide, the change of the local dielectric environment surrounding the surface of the nanorods, and mainly to an increase in polydispersity when the synthesis is performed in the presence of GO.

Considering using the GNR/GO hybrids as SERS substrate, the hybrid material was deposited onto a glass substrate as a thin film from solution. Fig. S2† presents optical and scanning electron microscopy images demonstrating that the obtained films are homogeneous in both macroscopic and microscopic scales. The advantage of this substrate is that it is simple to manufacture and can be applied to large surface areas. The optical absorption spectrum of the GNR/GO film is shown in Fig. 3 (black line), the spectrum of pure GO film is also shown for comparison (red line). The characteristic transverse and longitudinal peak can be observed in the GNR/GO film spectrum, however the longitudinal peak is strongly broadened and shifted in comparison with the peak in the GNR/GO in solution (Fig. 2). Such effect is expected and has been observed in spectra of pure GNR films.<sup>39</sup> It is attributed to the stronger coupling between plasmons in neighbor nanorods as the density of GNR is much larger in the films than in solution. It can also be due to the interaction of the GNR and the glass substrate.

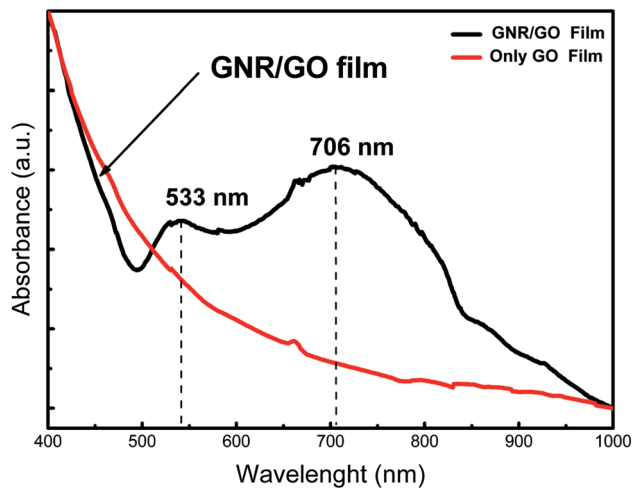


Fig. 3 Absorption spectra of the GNR/GO film (black line) and pure GO film (red line).

### SERS measurements

The dye cresyl violet perchlorate (CV)<sup>40</sup> was used for evaluation of the film as an active SERS substrate. The CV was deposited by drop casting onto the GNR/GO thin films. SERS measurements were carried out at various wavelengths to evaluate the best laser excitation resonance conditions of the GNR/GO film. Fig. S3† shows SERS measurements with a laser wavelengths of 488 nm, 514 nm, 568 nm and 647 nm. The 488 nm laser was out of resonance of the gold nanorods and a very weak Raman signal of CV was observed, clearly displaying the D ( $1330\text{ cm}^{-1}$ ) and G ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ) Raman bands of the GO. The 514 nm laser was close to the resonance of the transverse plasmon mode of the gold nanorods and a significant increase in signal was observed. The use of the 568 nm and 647 nm lasers results in the largest increases in the Raman signal since they approach the longitudinal plasmon resonance of gold nanorods in the GNR/GO film. The 647 nm laser was chosen for SERS studies in this work because it is closest to the resonant plasmon for thin films of GNR/GO as shown in Fig. 3.

The CV was deposited by drop casting on two substrates; on the standard glass and onto GNR/GO film. In both substrates three concentrations were used ( $10^{-5}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-11}$  M). In the glass substrate, a very weak Raman signal was detected but only when higher concentrations with long acquisition times (60 seconds) were used (inset in Fig. 4). On the other hand, the SERS effect appears clearly on the GNR/GO substrate showing an excellent signal at all concentrations and a monotonically drop with the decreasing concentration (Fig. 4). The black line in the Fig. 4 shows the Raman spectrum of CV on glass without any SERS effect.

### SERS mapping

SERS measurements of CV on the GNR/GO thin film substrates showed a high increase of Raman signal. However, the quality and uniformity of the substrates are fundamental for the development of commercial SERS substrates. In order to

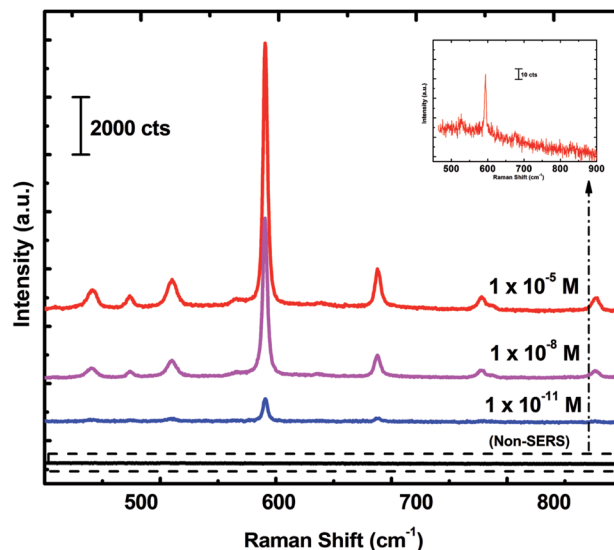


Fig. 4 SERS spectra of CV at different concentrations.

evaluate the GNR/GO substrate uniformity, SERS mapping was performed. The substrate was dipped for about 20 seconds in a solution of  $10^{-7}$  M of CV. Then Raman mapping measurements were made using the  $591\text{ cm}^{-1}$  peak as a reference. Fig. 5a shows an optical image of GNR/GO film as substrate and the Fig. 5b shows the SERS mapping. This figure shows the variation of Raman signal depending on the position on the

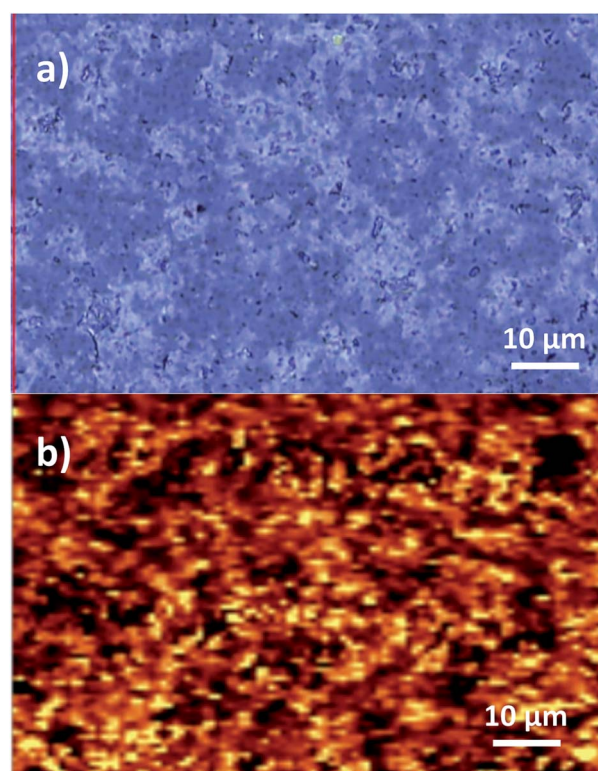


Fig. 5 SERS mapping of the GNR/GO hybrid film. (A) Optical image of GNR/GO film as substrate (B) SERS mapping.

substrate; the yellow range is the intensity of the CV SERS Raman signal peak at  $591\text{ cm}^{-1}$ . The variation of intensity is mainly due to the random distribution of CV molecules on the substrate and by variation in the substrate surface topography, since the depth of focus is small. Fig. S4† shows the same mapping SERS measurements at two different focal distances.

Substrate enhancement factors (SEFs) were calculated according to the methodology proposed by Le Ruet *et al.*<sup>41</sup> We assumed that all CV molecules were uniformly adsorbed within the test samples, due to their dilute concentration ( $10^{-7}\text{ M}$ ). The results of our calculations indicate an enhancement factor of the order of  $10^6$ .

GNR/GO film features high SERS enhancement factors with detection limits near picomolar concentrations for the aromatic dye used. Other authors have reported SERS studies using hybrids between GO and metallic nanoparticles.<sup>42</sup> However, gold nanorods are better for SERS than spherical nanoparticles as demonstrated by El-Sayed *et al.*<sup>43</sup> due to their high curvature and well-developed tunability of the surface plasmon resonance. Spherical nanoparticles only have a peak of plasmon resonance ( $\sim 520\text{ nm}$ ). On the other hand, gold nanorods have two plasmon modes, one transverse ( $\sim 520\text{ nm}$ ) and another longitudinal ( $\sim 640\text{--}1000\text{ nm}$ ), and both of them are active, though the longitudinal mode is the most intense, as shown in Fig. 3 and S3.† Other studies published in the literature have achieved enhancement of about  $10^4\text{--}10^5$  and detection limits of nanomolar concentrations.<sup>25,42,44,45</sup> The detection limits and enhancement factors obtained in our experiment are comparable or higher to the ones recently reported in the literature.

## 4. Conclusions

We have developed a simple method for the synthesis of nanocomposite between graphene oxide and gold nanorods. The process was carried out through the photochemical synthesis of gold nanorods by irradiation of ultraviolet light and their growth on graphene oxide. The synthesized material shows excellent distribution of nanorods in aqueous solution as characterized by images of transmission electron microscopy (TEM). A thin film was formed with the hybrids on a glass substrate, showing high detection sensitivity, easy preparation and high enhancement in the Raman signal (magnification factor of  $10^6$ ), while SERS mapping showed great uniformity.

## Acknowledgements

This work was supported by CAPES, Fapemig, CNPq, and INCT/Nanomateriais de Carbono. The authors acknowledge Mack-Gráphe for experiments involving SERS Mapping. The authors would like to acknowledge the Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

## References

- 1 D. L. Jeanmaire and R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.*, 1977, **84**, 1.
- 2 Y. Wang, B. Yan and L. Chen, *Chem. Rev.*, 2013, **113**(3), 1391.
- 3 N. Valley, N. Greeneltch, R. P. Van Duyne and G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, **4**, 2599.
- 4 S. K. Saikin, Y. Chu, D. Rappoport, K. B. Crozier and A. Aspuru-Guzik, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2010, **1**(18), 2740.
- 5 S. L. Kleinman, R. R. Frontiera, A. I. Henry, J. A. Dieringer and R. P. Van Duyne, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 21.
- 6 J. F. Betz, W. W. Yu, Y. Cheng, M. White and G. W. Rubloff, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 2224.
- 7 B. Sharma, M. F. Cardinal, S. L. Kleinman, N. G. Greeneltch, R. R. Frontiera, M. G. Blaber, G. C. Schatz and R. P. Van Duyne, *MRS Bull.*, 2013, **38**, 615.
- 8 W. J. Liao, P. K. Roy and S. Chattopadhyay, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 40487.
- 9 Q. Jiwei, L. Yudong, Y. Ming, W. Qiang, C. Zongqiang, W. Wudeng, L. Wenqiang, Y. Xuanyi, X. Jingjun and S. Qian, *Nanoscale Res. Lett.*, 2013, **8**, 437.
- 10 W. Hasi, S. Lin, X. Lin, X. Lou, F. Yang, D. Lina and Z. Lu, *Anal. Methods*, 2014, **6**, 9547.
- 11 R. W. Taylor, T. C. Lee, O. A. Scherman, R. Esteban, J. Aizpurua, F. M. Huang, J. J. Baumberg and S. Mahajan, *ACS Nano*, 2011, **5**, 3878.
- 12 S. T. Sivapalan, B. M. De Vetter, T. K. Yang, T. van Dijk, M. V. Schulmerich, P. S. Carney, R. Bhargava and C. J. Murphy, *ACS Nano*, 2013, **7**(3), 2099.
- 13 Q. Su, X. Ma, J. Dong, C. Jiang and W. Qian, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2011, **3**(6), 1873.
- 14 L. Vigderman and E. R. Zubarev, *Langmuir*, 2012, **28**(24), 9034.
- 15 H. Chen, L. Shao, Q. Lia and J. Wang, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 2679.
- 16 X. Huang, S. Neretina and M. A. El-Sayed, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 4880.
- 17 X. Ye, L. Jin, H. Caglayan, J. Chen, G. Xing, C. Zheng, V. DoanNguyen, Y. Kang, N. Engheta, C. R. Kagan and C. B. Murray, *ACS Nano*, 2012, **6**(3), 2804.
- 18 B. Nikoobakht and M. A. El-Sayed, *Chem. Mater.*, 2003, **15**(10), 1957.
- 19 N. R. Jana, L. Gearheart and C. J. Murphy, *Adv. Mater.*, 2001, **13**, 1389.
- 20 F. Kim, J. H. Song and P. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14316.
- 21 D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski and R. S. Ruoff, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 228.
- 22 S. Pei and H. Cheng, *Carbon*, 2012, **50**, 3210.
- 23 C. Zhua and S. Dong, *Nanoscale*, 2013, **5**, 10765.
- 24 P. T. Yin, T. Kim, J. W. Choic and K. B. Lee, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 12785.
- 25 C. Hu, J. Rong, J. Cui, Y. Yang, L. Yang, Y. Wang and Y. Liu, *Carbon*, 2013, **51**, 255.
- 26 Y. K. Kim, H. K. Na, Y. W. Lee, H. Jang, S. W. Hanb and D. H. Min, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3185.

- 27 S. Jayabal, P. Viswanathana and R. Ramaraj, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 33541.
- 28 U. Dembereldorj, S. Y. Choi, E. O. Ganbold, N. W. Song, D. Kim, J. Choo, S. Y. Lee, S. Kim and S. W. Joo, *Photochem. Photobiol.*, 2014, **90**, 659.
- 29 K. Yun, S. Seo, B. Kim, A. Joe, H. Han, J. Kim and E. Jang, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2013, **34**, 2795.
- 30 C. Xu, D. Yang, L. Mei, Q. Li, H. Zhu and T. Wang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, **5**, 12911.
- 31 L. Li, H. Lu and L. Deng, *Talanta*, 2013, **113**, 1.
- 32 W. Bai, H. Huang, Y. Li, H. Zhang, B. Lianga, R. Guo, L. Dua and Z. Zhanga, *Electrochim. Acta*, 2014, **117**, 322.
- 33 C. Xue, C. Kung, M. Gao, C. Liu, L. Dai, A. Urbas and Q. Li, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2015, **3**, 7–11.
- 34 W. Zhu, W. Liu, T. Li, X. Yue, T. Liu, W. Zhang, S. Yu, D. Zhang and J. Wang, *Electrochim. Acta*, 2014, **146**, 419–428.
- 35 W. S. Hummers Jr and R. E. Offeman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, **80**(6), 1339.
- 36 T. Placido, R. Comparelli, F. Giannici, P. D. Cozzoli, G. Capitani, M. Striccoli, A. Agostiano and M. L. Curri, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 4192.
- 37 O. R. Miranda and T. S. Ahmadi, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**(33), 15724.
- 38 K. Nishioka, Y. Niidome and S. Yamada, *Langmuir*, 2007, **23**(20), 10353.
- 39 S. Yun, M. Kyung Oh, S. Kyu Kim and S. Park, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**(31), 13551.
- 40 E. Vogel, A. Gbureck and W. Kiefer, *J. Mol. Struct.*, 2000, **550–551**, 177.
- 41 E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer and P. G. Etchegoin, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**(37), 13794–13803.
- 42 J. Huang, L. Zhang, B. Chen, N. Ji, F. Chen, Y. Zhanga and Z. Zhang, *Nanoscale*, 2010, **2**, 2733–2738.
- 43 B. Nikoobakht, J. P. Wang and M. A. El-Sayed, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, **366**(1), 17.
- 44 T. H. D. Nguyen, Z. Zhang, A. Mustapha, H. Li, M. Lin and J. Agric, *Food Chem.*, 2014, **62**(43), 10445–10451.
- 45 A. Saha, S. Palmal and N. R. Jana, *Nanoscale*, 2012, **4**, 6649.

# Biosensor based on rotational dynamics of gold nanorods

Anderson J. Caires<sup>a,b</sup>, Adriano J. Silva<sup>c</sup>, Pedro Licinio<sup>c</sup>, Ary Junior<sup>d</sup>, Luiz O. Ladeira<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemical Engineering, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

<sup>b</sup>Microscopy Center, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

<sup>c</sup>Department of Physics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

<sup>d</sup>Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

**Corresponding author:** andersoncaires@outlook.com

## ABSTRACT

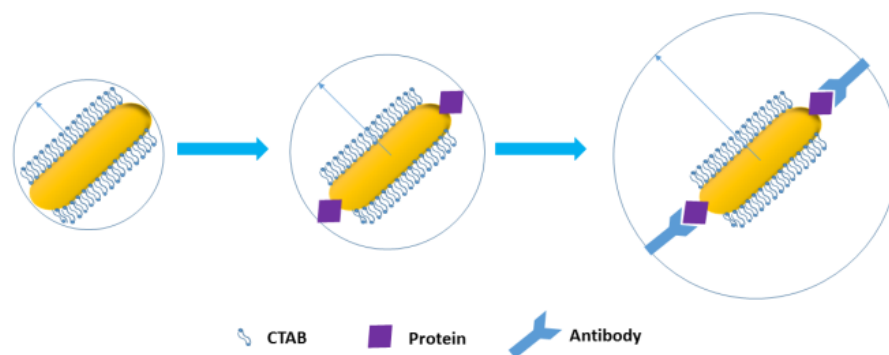
We report a detection system based on the rotational dynamics of gold nanorods in colloidal solution by depolarized dynamic light scattering (DDLS) measurements. Biomolecules are attached chemically on the end faces of Gold nanorods (GNRs). This process changes its rotational diffusion since modifies the effective length and friction coefficient of the nanorods. Measures of rotational diffusion coefficient by DDLS technique allow the detection of bio-molecules interactions with GNRs. Specific adsorption of Immunoglobulin E (IgE) and anti-IgE was chose as a model for concept demonstration.

Keywords: Gold Nanorods, Rotational, Biosensor, depolarized dynamic light scattering (DDLS).

## INTRODUCTION

Detection of chemical and biological compounds is of great importance, especially in disease diagnosis. Currently the most widely used method for this purpose is ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) [1], which is based on detection and quantification of specific antibody or antigen by color changes due to an intermediary enzyme reaction. The method, however, uses heterogeneous protocols with many steps and being further indirect because of the enzyme-mediated reaction, being time consuming and restricted to specialized laboratories. The molecular recognition methods generally make use of a receptor conjugate to the analyte of interest (molecule capable of forming a strong specific analyte-receptor binding pair). In many methods reported recently optical techniques [2] were used to detect binding pairs occurred at receptors previously attached to metal nanoparticles. Many other chemical detection methods have been studied recently, highlighting the inelastic and quasi-elastic light scattering methods surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) [3] and dynamic light scattering (DLS) [4]. In the DLS method, some biological interaction can cause the aggregation of spherical nanoparticles probes, forming large clusters and thus changing their translational diffusivity, which is easily detected by standard measurement of the polarized light scattered by the colloidal solution. This method has been successfully used previously [5-8]; however, it has the disadvantage of multiple interactions between particles and aggregates may reduce the specificity and selectivity of the method. On the other hand, for anisotropic nanoparticle probes, such as GNRs [9],

depolarization allows for the measurement of rotational diffusion. The strong depolarized light scattering of GNRs can easily override any other depolarized scattering from other biomolecules even in a congested sample, making GNR the optical probe of choice. Spherically perfect and pure gold nanoparticles are unable to depolarize an incident light, although a measurable depolarized light is scattered if they have a small deviation from a sphere [10]. Scattering from other macromolecules are usually negligible at appropriate concentrations of GNRs. Furthermore, while translational diffusivity is inversely proportional to the size of a nanoparticle, rotational diffusivity is to the cube of its size, and both have a complex dependence on the particle's aspect ratio (length to diameter ratio for rods). Therefore, the viscous drag increase, after analyte binds to GNR coupled receptor, considerably decreases its rotational diffusivity and the autocorrelation time decay of depolarized scattered light can be used with enormous sensitivity. We report a detection system based on the rotational dynamics of gold nanorods in colloidal solution (Scheme 1), for detection of antibodies by DDLs measurements.



Scheme 1 - Schematic illustration of the detection process. The interaction biology modifies the hydrodynamic radius of the gold nanorods.

## MATERIAL AND METHODS

In our experiments, GNRs were prepared by seed-mediated growth method previously described by Zubarev *et al* to synthesize gold nanorods of high aspect ratio using Hydroquinone as reducing agent [11]. This synthesis uses as growth solution tetrachloroauric acid (HAuCl<sub>4</sub>), hexadecyl-trimethylammonium bromide (CTAB), ascorbic acid and silver nitrate. Addition of a small amount of spherical gold nanoparticles (Seed solution) initiates GNRs' growth. Seed solution was prepared by mixing 10 ml (0.1 M) of CTAB and 100  $\mu$ L (0.1 M) of HAuCl<sub>4</sub> solution and adding 0.5 mL of 0.01 M of NaBH<sub>4</sub>, with stirring for 1 min. A solution color changes from brown to bright brown. The seed solution is kept in a 28 °C in water bath for 1 h prior to use. The growth solution is prepared mixing 100 mL (0.1 M) of CTAB with 100  $\mu$ L (0.1 M) of HAuCl<sub>4</sub> and subsequently adding 1 mL (0.1 M) of AgNO<sub>3</sub> in a beaker. It was then added 500  $\mu$ L of hydroquinone solution (0.1 M), and the resulting mixture stirred until it became clear. The solution changes from yellow color to clear, indicating the reduction of Au<sup>+3</sup> to Au<sup>+1</sup>. The final step is the addition of seed solution volume from 50  $\mu$ L to the growth solution. The seeds added catalyze a further reduction of Au<sup>+1</sup> for Au<sup>0</sup> to form GNRs. The temperature of the growth solution was kept constant at 30° C. The GNR solution as synthesized is three times centrifuged at 5600 g for 15 min to remove CTAB excess. The synthesized nanorods were functionalized using a similar method reported by other authors [12,13]. In this method 10 mL of as synthesized GNRs were diluted in 10 mL of deionized water, and then was added 200  $\mu$ L (10 mM) of lipoic acid and sonicated for one hour.

Following functionalization of the GNRs with lipoic acid the solution was centrifuged to remove acid molecules not linked to the nanorods and dispersed in 1X of isotonic phosphate buffer. After adding 10  $\mu\text{L}$  of EDAC/NHS (0.4 M: 0.1 M) to the solution, it was sonicated at 4° C for 30 min. Then, 100  $\mu\text{L}$  of biomolecules (protein or antibody) were added for 10 mL of functionalized gold nanorods with 15 min of incubation time. DLS measurements were performed within the next hour after biomolecules addition, using a thermostated bath at 36.7 °C to maintain CTAB solubility. The DLS apparatus used was a Brookhaven BI9000 correlator operating in 90° scattering geometry setup,  $\lambda = 633 \text{ nm}$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

The transmission electron microscopy (TEM) images of synthesized gold nanorods are shown in figure 1. The absorbance spectrum of GNRs in colloidal solution shows resonance peaks of transverse and longitudinal Plasmon at 520 nm and 945 nm respectively (figure 1c). The resulting GNRs samples had its aspect ratio distribution estimated by TEM images (figure 1d).

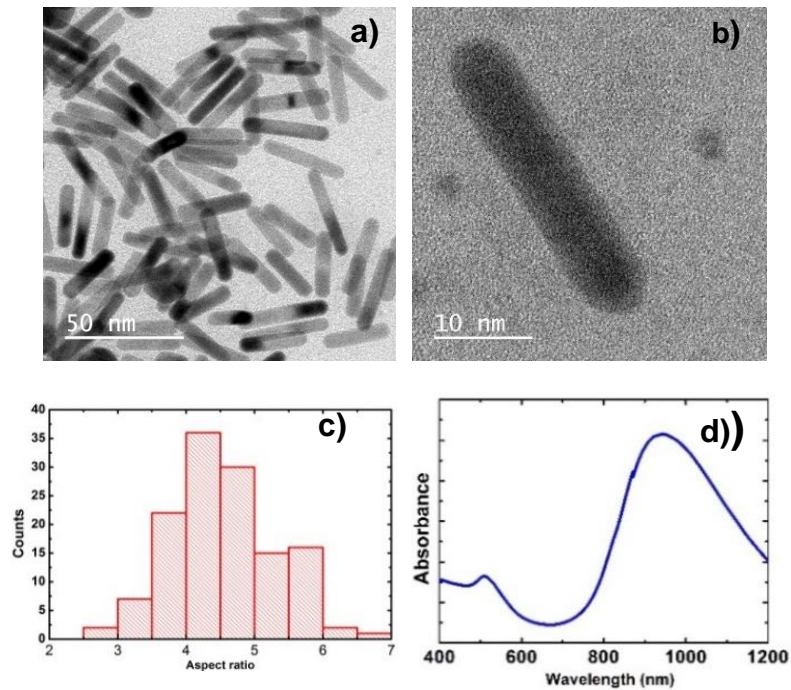


Figure 1. (a, b) Transmission Electron Microscopy (TEM) of the synthesized GNRs. (c) Histogram showing the aspect ratio distribution of the GNRs. (d) Absorbance spectrum of the GNRs.

In order to use GNRs in DDLs bio-detection measurements, the synthesized nanorods were functionalized using a similar method reported by other authors [12-13]. In this method 10 mL of as synthesized GNRs were diluted in 10 mL of deionized water, and then was added 200  $\mu$ L (10 mM) of lipoic acid and sonicated for one hour. In this process, lipoic acid molecules become attached to the {111} end faces leaving a carboxyl group attached to the GNRs. The functionalization is the result of covalent linkage between the carboxyl radicals present in lipoic acids in the ends of GNRs

through links between sulfur present in these acids and the GNRs. This binding takes place only at the ends because the side surface of the nanorods has a CTAB bi-layer as the result of the synthesis process as reported by other authors [14]. The bond between amine radicals present on proteins, antibodies, or other biomolecule and ends of GNRs was accomplished by amidation activated by diimide. Following functionalization of the GNRs with lipoic acid the solution was centrifuged to remove acid molecules not linked to the nanorods and dispersed in 1X of isotonic phosphate buffer. After adding 10  $\mu\text{L}$  of EDAC/NHS (0.4 M: 0.1 M) to the solution, it was sonicated at 4° C for 30 min. This procedure is responsible for activating the carboxylic grouping present in lipoic acid. This grouping will become reactive to link up with amines. The active solutions were centrifuged at 3600 rpm for 10 min and disperse in 1X phosphate buffer solution. These functionalized GNRs were tested as biomolecular detection probes. The previously activated nanorods were connected with bovine serum albumin (BSA) protein in order to test whether the measures could detect proteins; similarly, to reports of other authors [15-16] in DLS experiments. Firstly, 100  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{M}$ ) of BSA were add for 10 mL of functionalized gold nanorods with 15 min of incubation time, following the solution were filtered through Millipore (200 nm) membrane to remove any aggregates and reminiscent protein in the solution.

Figure 2 shows the results of DLS measurements with GNRs linking to BSA protein. In this figure, the black line is the measurement of GNRs as previously activated and the red line is the result with the addition of BSA.

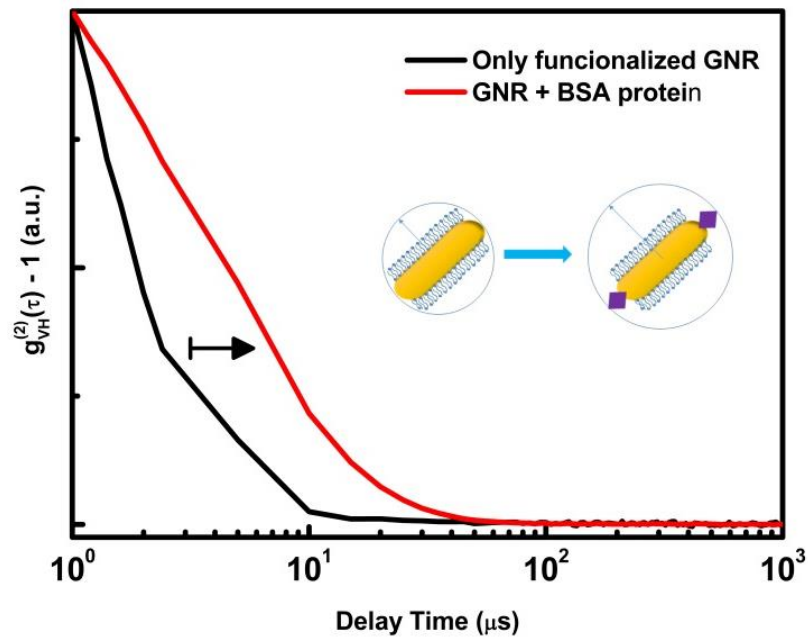


Figure 2. Depolarized (v-h) intensity autocorrelation functions ( $g^2(t)$ ) of functionalized gold nanorods (Black) and gold nanorods linked with BSA protein (red)

The addition of BSA protein increases the hydrodynamic radius of the GNRs increasing the characteristic decay time of the correlation function. According to Tirado and Garcia de la Torre hydrodynamic calculations modelling the rotational diffusion of short cylinders [17], the observed 2.32 times lower coefficient of rotational diffusion in the presence of BSA, corresponds to a layer of 3.0 nm around the ends and side of the functionalized GNRs. This technique can be used to study different types of interactions between proteins and anisotropic nanoparticles, being an improvement over the techniques that use only translational dynamic measures [18].

In order to test the proposed mechanism as a bio-sensing tool the specific adsorption of Immunoglobulin E (IgE) and anti-IgE was used as a model platform. Firstly, 10  $\mu$ L (1 mM) of IgE antibody were added for 10 mL of functionalized gold nanorods with 15 minutes of incubation time, and the solution filtered through a Millipore (200 nm) membrane to remove any aggregates and remaining IgE in the solution. In following 10  $\mu$ L (1 mM) of Anti-IgE antibody were added. Figure 3 shows the results of DDLs measurements with GNRs linked with IgE antibody and the detection of Anti-IgE antibody as proof-of-concept. These measurements were performed with 15 min of incubation time the IgE to activated nanorods and 1 hour of incubation time from Anti-IgE. In this figure, the black line is the result of the measurements of GNRs as previously activated and the red line is the result with the addition of 10  $\mu$ L of IgE antibody. The addition of IgE antibody increases the hydrodynamic radius of the GNRs increasing the characteristic decay time of the correlation functions. The addition of anti-IgE antibody is easily detected because the increase in size of the nanorods associated with the mass increase also increases the characteristic relaxation time of the correlation function as seen in green in Figure 3. Calculations using the supra cited rheological model for short cylinders, indicate an increase of 3.8 nm and 6.5 nm, only at the ends of the GNRs, after addition of IgE and anti-IgE antibodies, respectively.

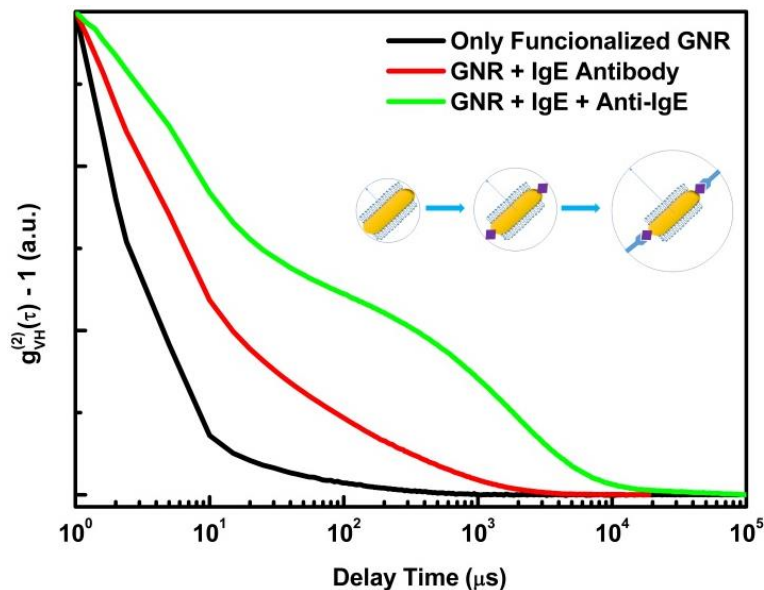


Figure 3. Depolarized (v-h) intensity autocorrelation functions ( $g_2(t)$ ) of functionalized gold nanorods (Black), gold nanorods linked with IgE Antibody (red) and Anti-IgE antibody detection (green).

## CONCLUSIONS

In conclusion, in this short communication we report a new and simple method for detecting biomolecules using the rotational dynamics of gold nanorods in colloidal solution by DDLS measurements. Dynamic light scattering measurements with depolarized light of gold nanorods coupled with BSA protein showed that this method could detect proteins attached to gold nanorods. Furthermore, we reported as a proof of concept, the detection of anti-IgE antibody through DDLS measurements with gold nanorods previously coupled with the IgE antibody.

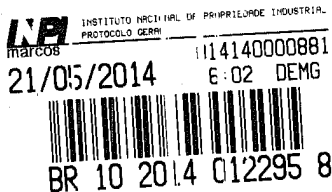
## ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by CNPq, FAPEMIG and CAPES. The authors would like to acknowledge the Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

## REFERENCES

- [1] S.D. Gan, K.R. Patel, J. Investig. Dermatol, **2013**, 133, 1–3.
- [2] Wen Zhou, Xia Gao, Dingbin Liu, Xiaoyuan Chen, Chem. Rev., 2015, 115 (19), 10575–10636.
- [3] Wang Y., Yan B, Chen L. Chem Rev. 2012, 113 (3), 1391-428.
- [4] Jans H, Liu X, Austin L, Maes G, Huo Q. Anal. Chem. 2009, 81, 9425-9432.
- [5] Xiong Liu, Qiu Dai, Lauren Austin, Janelle Coutts, Genevieve Knowles, Jianhua Zou, Hui Chen, Qun Huo, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130 (9), 2780–2782.
- [6] Xiong Liu, Qun Huo, J Immunol Methods. 2009, 349 (1-2): 38-44.
- [7] Qiu Dai, Xiong Liu, Janelle Coutts, Lauren Austin, Qun Huo, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130 (26), 8138–8139.
- [8] Bocheng Zhang, Tao Lan, Xiangyi Huang, Chaoqing Dong, Jicun Ren, Anal. Chem., 2013, 85 (20), 9433–9438.
- [9] Huanjun Chen, Lei Shao, Qian Li, Jianfang Wang, Chem. Soc. Rev., 2013, 42, 2679-2724

- [10] Balog, S., Rodriguez-Lorenzo, L., Monnier, C. A., Michen, B., Obiols-Rabasa, M., Casal-Dujat, L., Rothen-Rutishauser, B., Petri-Fink, A. & Schurtenberger, P. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2014, 118, 17968-17974
- [11] Leonid Vigderman, Eugene R. Zubarev, *Chem. Mater.* 2013, 25, 1450–1457.
- [12] Jia-Yaw Chang, Huimeng Wu, Hui Chen, Yong-Chien Ling, Weihong Tan, *Chem. Commun.*, 2005, 1092-1094;
- [13] Park, W. M., Choi, B. G., Huh, Y. S., Hong, W. H., Lee, S. Y. and Park, T. J. *ChemPlusChem*, 2013, 78, 48–51.
- [14] Seunghyun Lee, Lindsey J. E. Anderson, Courtney M. Payne, Jason H. Hafner, *Langmuir*, 2011, 27 (24), 14748–14756.
- [15] Federica Scaletti, Alessandro Feis, Sonia Centi, Roberto Pini, Vincent M. Rotello, Luigi Messori, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015, 150, 120–125.
- [16] Sharmine Alam, Ashis Mukhopadhyay, *J. Phys. Chem. C*, 2014, 118 (47), 27459–27464.
- [17] Tirado, M. & Garcia de la Torre, J. Rotational dynamics of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders *The Journal of Chemical Physics*, 1980, 73, 1986-1993.
- [18] Helin Liu, Nickisha Pierre-Pierre, Qun Huo, *Gold Bulletin*, 45, 4, 187-195.



Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**  
**Sistema de Gestão da Qualidade**  
**Diretoria de Patentes**

<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>1/3</b>
	Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>	Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>2</b>
		Procedimento: <b>DIRPA-PQ006</b>	

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
- 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
- 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
- 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil
- 1.5 CEP: 31270-901
- 1.6 Telefone: (31) 3409-4774
- 1.7 Fax: (31) 3409-6430
- 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

**2. Natureza:**

- Invenção       Modelo de Utilidade       Certificado de Adição

**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

MÉTODO FOTOQUÍMICO PARA OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS HÍBRIDAS DE METAIS E NANOMATERIAIS DE CARBONO E SUAS APLICAÇÕES E USOS

continua em folha anexa

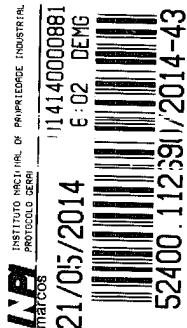
**4. Pedido de Divisão: do pedido Nº      Data de Depósito:**

**5. Prioridade:**       Interna (66)       Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

continua em folha anexa





<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário</b>	DIRPA	Página: <b>2/3</b>
	Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>	Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>2</b>
		Procedimento: <b>DIRPA-PQ006</b>	

**6. Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: LUIZ ORLANDO LADEIRA

6.2 Qualificação: PROFESSOR

6.3 CPF: 137.203.766-72

6.4 Endereço Completo: RUA TARANTO, 144, BAIRRO BANDEIRANTES, BELO HORIZONTE, MG

6.5 CEP: 31.340-550

6.6 Telefone: 31 3409-4774

6.7 FAX: 31 3409-6430

6.8 E-mail:

continua em folha anexa

**7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.**

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

**8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:**

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

**9. Procurador (74):**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

**10. Listagem de sequências biológicas.**

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Sistema de Gestão da Qualidade  
Diretoria de Patentes

<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>3/3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>2</b>
		Procedimento: <b>DIRPA-PQ006</b>	

**11. Documentos Anexados:**

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	02
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	12
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	02
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n <sup>o</sup> , _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	06
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	01
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ n <sup>o</sup> de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) Portaria, Anexo de Inventores.	02

12. Total de folhas anexadas: 25 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Belo Horizonte, 21/05/2014

Local e Data

Adelina M. R.

Assinatura e Carimbo

profa. Adelina Martha dos Reis  
Pró-Reitora de Pesquisa/ UFMG  
Portaria n<sup>o</sup> 1.536/2014

## **ANEXO DE INVENTORES**

**Título: MÉTODO FOTOQUÍMICO PARA OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS HÍBRIDAS DE METAIS E NANOMATERIAIS DE CARBONO E SUAS APLICAÇÕES E USOS**

Página 1

---

Nome: ANDERSON CAIRES DE JESUS

Qualificação: PESQUISADOR

CPF: 066.451.666-13

Endereço Completo: RUA HUM, 1256, BL. 01, APTO. 101, BAIRRO MIRANTE, IBIRITÉ, MG

CEP: 32.400-000

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail:

---

Nome: DIEGO CARVALHO BARBOSA ALVES

Qualificação: PROFESSOR

CPF: 668.092.313-15

Endereço Completo: RUA DEPUTADO AUGUSTO GONÇALVES, 550, APTO. 301, BAIRRO SERRANO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30.882-660

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail:

---

Nome: ANDRÉ SANTAROSA FERLAUTO

Qualificação: PROFESSOR

CPF: 057.518.778-61

Endereço Completo: RUA MARQUÊS DE MARICÁ, 414, APTO. 301, BAIRRO SANTO ANTÔNIO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30350-070

Telefone: 31 34094774

FAX: 31 34096430

E-mail:

---

Nome: RAISSA PIERONI VAZ

Qualificação: PESQUISADORA

CPF: 074.550.066-83

Endereço Completo: PRAÇA MIGUEL CHIQUILOFF, 41, APTO. 202, BAIRRO SION, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30.320-110

Telefone: 31 34094774

FAX: 31 34096430

E-mail:

---

Nome: SAMARY ALEJANDRA ESPITIA FAJARDA

Qualificação: PESQUISADORA COLOMBIANA

CPF:

Endereço Completo: RUA 72 A, Nº 77-75, APTO. 301, BAIRRO ZARZAMORA, BOGOTÁ, D.C.

CEP:

Telefone:

FAX:

E-mail:

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PROCOLO DEPL  
MARCOS 014150001777  
27/11/2015 16:13 DEMG  
BR 10 2015 029831 5

< Uso exclusivo do INPI >

693  
UFMG

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Sistema de Gestão da Qualidade  
Diretoria de Patentes

<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário</b>	DIRPA	Página: <b>1/3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>2</b>
		Procedimento: <b>DIRPA-PQ006</b>	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
- 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
- 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
- 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil
- 1.5 CEP: 31270-901
- 1.6 Telefone: (31) 3409-4774
- 1.7 Fax: (31) 3409-6430
- 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

2. **Natureza:**  Invenção  Modelo de Utilidade  Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

"MÉTODO E KIT PARA DETECÇÃO DE ANALITOS EM MEIO FLUIDO COM NANOBASTÕES METÁLICOS ATRAVÉS DE ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ E USOS"

continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão:** do pedido Nº \_\_\_\_\_ **Data de Depósito:** \_\_\_\_\_

5. **Prioridade:**  Interna (66)  Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PROCOLO DEPL  
27/11/2015 16:13 DEMG

continua em folha anexa

52400.073301/2015-38