

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA E ASTRONOMIA

JULIANA THALER

**ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE COM  
NANOPARTÍCULAS DE Ni, Co e Bi PARA A DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E  
MICRORGANISMOS**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2020

JULIANA THALER

**ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE COM  
NANOPARTÍCULAS DE Ni, Co e Bi PARA A DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E  
MICRORGANISMOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Física e  
Astronomia da Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná como requisito para a aquisição de  
título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Arandi Ginane Bezerra Junior

Coorientador: Prof. Dr. Wido Herwig Schreiner

CURITIBA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

Thaler, Juliana

Espectroscopia Raman amplificada por superfície com nanopartículas de Ni, Co e Bi para a detecção de biomoléculas e microrganismos [recurso eletrônico] / Juliana Thaler.-- 2020.

1 arquivo texto (107 f.): PDF; 6,6, MB.

Modo de acesso: World Wide Web

Título extraído da tela de título (visualizado em 5 ago. 2020)

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-graduação em Física e Astronomia, Curitiba, 2020

Bibliografia: f. 94-102

1. Física - Dissertações. 2. Astronomia - Dissertações. 3. Biomoléculas - Identificação. 4. Nanopartículas. 5. Efeito Raman, Superfície aprimorada. 6. Biossensores. 7. Níquel. 8. Cobalto. I. Bezerra Junior, Arandi Ginane. II. Schreiner, Wido Herwig. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Física e Astronomia. IV. Título.

---

CDD: Ed. 23 – 530

Biblioteca Central da UTFPR, Campus Curitiba

Bibliotecário: Adriano Lopes CRB-9/1429



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

## TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO

A Dissertação de Mestrado intitulada **“Espectroscopia RAMAN amplificada por superfície com nanopartículas de Ni, Co e Bi para a detecção de biomoléculas e microrganismos”**, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Juliana Thaler**, no dia 08 de junho de 2020, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Física e Astronomia, Área de concentração Física, Linha de pesquisa Física da Matéria Condensada, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Arandi Ginane Bezerra Jr. – Presidente - UTFPR

Profa. Dra. Libera Maria Dalla Costa - IPPPP

Profa. Dra. Anna Luiza Metidieri Cruz Malthez - UTFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 08 de junho de 2020.

---

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro ao autor e consumidor de toda existência e mistérios do Universo que tanto me cativa, inspira e instiga; Deus! Também aos meus pais que sempre me ensinaram a ser e fazer o melhor com o que tenho; minha irmã maravilhosa (e braço direito) que me auxilia diariamente para que eu possa cuidar de todos os afazeres. Aos meus queridos e sábios orientadores, Prof. Dr. Arandi G. Bezerra Jr. e Prof. Dr. Wido H. Schreiner, que me instruíram com muita paciência, atenção, dedicação e carinho durante todo o período de desenvolvimento do trabalho. Agradeço também a equipe SENSACIONAL do laboratório FotoNanoBio, especialmente o Thiago e a Raquel que me acompanharam em muitas etapas divertidas nos últimos dois anos. A Sofi, Gui, Bruna e Duda por me guiarem nas descobertas incríveis do Reino Fungi, assim como toda a equipe do LabMicro, especialmente a prof. Dra. Vânia Vicente que não só me presenteou com uma aplicação especial do que havia pesquisado, mas também me proporcionou a oportunidade de contemplar o horizonte de futuros trabalhos a partir daqui. Também ao Prof. Dr. Edilson que me apresentou ao grupo da Biotecnologia. Aqui vai um obrigado especial ao Prof. Dr. Rafael Eleodoro de Góes por ter aceitado uma missão especial e fundamental para a continuidade da pesquisa, seus talentos são de suma importância e muito valorosos, obrigada! E também ao CME (Centro de Microscopia Eletrônica) assim como toda a equipe técnica por me aturarem em muitas ligações e longas tardes de medidas importantes. Deixo registrado também um obrigado mais que fundamental ao Instituto Pelé Pequeno Príncipe e toda a equipe pela parceria nas descobertas importantes que tivemos nas últimas aplicações, sem vocês não teríamos conseguido, obrigada! À Marina e ao Bruno por me receberem e auxiliarem no dia da defesa, muito obrigada time!

Agradeço também a CAPES pelo financiamento da pesquisa.

Finalmente, a FJU e ao Força Jovem Universitários pelo apoio e suporte, pois foi através dos projetos que aprendi sobre a fé e reconheci meu potencial para me tornar mais do que eu podia ver até ali. Muito obrigada!

*“Porque melhor é a sabedoria do que os rubis;  
e tudo o que mais se deseja não se pode comparar com ela.” Pv.8:11*

## RESUMO

THALER, Juliana. ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE COM NANOPARTÍCULAS DE Ni, Co e Bi PARA A DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E MICRORGANISMOS. 2020. 107f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

Nesta dissertação é demonstrada a atividade Plasmônica de nanopartículas de níquel, cobalto e bismuto, com ênfase em espectroscopia RAMAN amplificada por superfície, ou *Surface-Enhanced Raman Scattering* (SERS), para a detecção de biomoléculas (aminoácidos e ureia) e microrganismos (fungos: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *Fusarium spp.*, *F. pedrosoi*, *F. pugnacius* e *F. monophora*). As nanopartículas foram sintetizadas por meio de ablação via laser em meio líquido e os coloides obtidos foram utilizados para a intensificação do sinal Raman, obtendo espectros SERS. Os coloides também serviram de base para a produção de substratos, por meio da técnica de “drop-casting”, com as nanopartículas sendo depositadas em lâminas de vidro, na presença de campos magnéticos, a fim de produzir filmes mais homogêneos e com potencial de servirem para experimentos SERS mais eficientes em comparação ao tradicional. Foram utilizadas diversas técnicas de caracterização: espectroscopia UV-Vis, espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e de varredura (MEV), espectroscopia de dispersão em energia (EDS), microscopia de força atômica (AFM) e perfilometria ótica. Para obtenção dos espectros vibracionais dos analitos, foi utilizado um espectrômetro Raman confocal, com laser de excitação em 532nm. Espectros SERS foram comparados com os obtidos usando nanopartículas de ouro, demonstrando que níquel, cobalto e bismuto constituem materiais promissores para aplicação em biossensores baseados em SERS. Em particular, os resultados obtidos também demonstram que estas nanopartículas têm potencial de ser utilizadas para a identificação e diferenciação de fungos (gênero e espécie).

**Palavras-Chave:** Níquel. Cobalto. Nanopartículas. SERS. Fungos. Biossensores.

## ABSTRACT

THALER, Juliana. SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY (SERS) WITH Ni, Co AND Bi NANOPARTICLES FOR THE DETECTION OF BIOMOLECULES AND MICROORGANISMS. 2020. 107f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

In this dissertation we demonstrate plasmonic activity of Ni, Co and Bi nanoparticles, with emphasis on Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), for the detection of biomolecules (amino acids and urea) and microorganisms such as fungi (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* and *Fusarium sp.*, *F. pedrosoi*, *F. pugnacius* and *F. monophora*). Nanoparticles were synthesized via laser ablation in liquid medium and the obtained colloids were used to intensify Raman signals in experiments in which drops of nanoparticles were added to the analytes, allowing the mixture to dry to obtain the SERS spectra. The colloids were also used for the production of substrates, through the “drop-casting” technique, with nanoparticles being deposited on glass slides in the presence of magnetic fields, in order to produce homogeneous films with potential for application in SERS experiments. In the former case, the analytes were also deposited onto substrates for SERS spectra measurements. Several characterization techniques were used: UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), transmission (TEM) and scanning electron microscopy (SEM), energy dispersion spectroscopy (EDS), atomic force microscopy (AFM) and optical profilometry. To obtain the vibrational spectra of the analytes, a confocal Raman spectrometer was used, with an excitation laser at 532nm. SERS spectra were compared to those obtained using Au nanoparticles, showing that Ni, Co and Bi are promising materials for the development of SERS-based biosensors. In particular, our results demonstrate that these nanoparticles have the potential to be used for the identification and differentiation of fungi (genus and species).

**Keywords:** Nickel. Cobalt. Nanoparticles. SERS. Fungi. Biosensors.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Potencial de aplicação da nanotecnologia em diversos campos. ....	14
Figura 2 – Possibilidades de composição e funcionalização de nanopartículas. ....	15
Figura 3- Representação dos conceitos de espalhamento Rayleigh, Stokes e anti-Stokes quando há um fóton incidente com frequência $\omega_{inc}$ interagindo com uma molécula da amostra com frequência vibracional $\omega_{vib}$ . No caso do espalhamento Stokes a molécula absorve energia espalhada, enquanto no anti-Stokes, a molécula perde energia e resulta em um aumento da energia espalhada. ....	17
Figura 4 - (a) ilustração do efeito LSPR em uma nanopartículas de metal na presença de uma onda eletromagnética com frequência $\omega_{inc}$ . com frequência de plasmon ressonante. (b) mecanismo de amplificação SERS eletromagnético (esquerda) e químico (direita). ....	19
Figura 5- Nanofotônica organização de escala. ....	20
Figura 6 - Representação da NanoBioFotônica. ....	21
Figura 7 - Algumas imagens em nível molecular (fragmentos de DNA), celular (bactérias) e também em tecidos (epitelial) como aplicações da NanoBioFotônica. ....	21
Figura 8 - Esquema de ablação a laser. Um feixe de laser interage com um material alvo, levando à formação de plasma (não mostrado) e bolha de cavitação (mostrado aqui em seu tamanho inicial) no qual a matéria “ablada” condensa. Após o colapso da bolha de cavitação, as nanopartículas são dispersas no líquido. ....	26
Figura 9 - Esquema de interação da luz com as nanopartículas coloidais em movimento Browniano, fundamento da técnica de DLS. (a) A luz espalhada produz padrões de interferência variáveis no tempo. (b) Estes padrões obedecem a uma função de correlação que pode ser associada a um modelo matemático do qual se pode determinar a distribuição de tamanhos das nanopartículas. ....	31
Figura 10 - Diagrama esquemático do microscópio de força atômica (AFM). Um sinal de resposta da detecção do laser refletindo no espelho que é montado no cantilever fornece um sinal para mover os átomos da amostra para cima ou para baixo para manter a força do cantilever constante. O movimento da ponta traça os contornos dos átomos da amostra. ....	34
Figura 11 - Ilustração da configuração experimental para a ablação a laser (esquerda) e uma foto do processo tal como se dá no laboratório (direita). ....	44
Figura 12 - À esquerda, (plano principal) o espectrômetro UV-Vis. À direita, as cubetas utilizadas para o experimento, assim como os eppendorffs (ao fundo) com nanopartículas e os béqueres com nanopartículas (Bi) e água respectivamente. ....	45
Figura 13 - À esquerda, o DLS e, à direita, as cubetas utilizadas para o experimento, assim como o béquer com nanopartículas (Bi) ....	46
Figura 14 - Produção dos substratos: (a) Lâminas de silício e vidro (esquerda). (b) Lâminas de vidro sobre os ímãs (centro). (c) Diversas gotas de um coloide depositadas para secar na lâmina de vidro sob ação do campo magnético do ímã. ....	47
Figura 15 - Esquerda - filmes de nanopartículas de Co em lâmina de vidro (esquerda): note-se que há quatro regiões com nanopartículas depositadas; cada região pode ser utilizada para um experimento SERS distinto. Direita – após secagem do analito depositado, o substrato é iluminado com o laser para o experimento no espectrômetro Raman. ....	50
Figura 16 - Imagem da configuração experimental do microscópio Raman. Gotas (tipicamente 2 a 4 $\mu$ l) contendo nanopartículas e analitos são depositadas em uma lâmina de microscópio e, após secas, vão para análise. A lâmina é colocada em uma base móvel e o laser é focalizado	

de cima para baixo; a luz espalhada é coletada pela mesma lente e processada pelo equipamento.....	51
Figura 17 - Imagem dos fungos cultivados usados como base para as primeiras detecções via SERS.....	53
Figura 18 - Tenebrios inoculados com os fungos negros. ....	54
Figura 19 - Fotografia de Eppendorff contendo coloide de nanopartículas de Bi, Ni, Co e Au. A coloração da suspensão depende da concentração, tamanho e formato das nanopartículas.....	55
Figura 20 - demonstração do caráter ferromagnético das nanopartículas de Co, que são atraídas pelo ímã.....	56
Figura 21 - Extinção para os coloides de Co, Ni e Bi, respectivamente.....	57
Figura 22 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em suspensão, medido por DLS, com diâmetro médio centrado em 10 nm, 15 nm e 38 nm, respectivamente para Co, Ni e Bi. ....	58
Figura 23 - Dados obtidos do perfilômetro: o lado esquerdo mostra o substrato de NiNP em que as gotas com nanopartículas secaram sem o ímã, enquanto que as da direita se referem aos substratos secos com as lâminas sobre o ímã.....	59
Figura 24 - Dados obtidos do perfilômetro: o lado esquerdo mostra o substrato de CoNP em que as gotas com nanopartículas secaram sem o ímã e as da direita já secos com as lâminas sobre o ímã.....	60
Figura 25 - Dados obtidos do perfilômetro: o lado esquerdo mostra o substrato de BiNP em que as gotas com nanopartículas secaram sem o ímã, enquanto que as da direita se referem aos substratos secos com as lâminas sobre o ímã. ....	60
Figura 26 - Dados de rugosidade obtidos com o AFM para a amostra de NiNP.....	61
Figura 27 - Dados de rugosidade obtidos com o AFM para a amostra de CoNP.....	62
Figura 28 - Dados de rugosidade obtidos com o AFM para a amostra de BiNP. ....	62
Figura 29 - Microscopia de transmissão das nanopartículas de Ni, Co e Bi, respectivamente. ...	64
Figura 30 - Microscopia eletrônica de transmissão para fungos hialinos e dematiaceos em solução aquosa com nanopartículas de cobalto depositadas na superfície de estruturas reprodutivas e vegetativas. A e B- Conídio da espécie <i>Fusarium oxysporum</i> em campo claro e escuro respectivamente; C- Fragmento de hifa da espécie <i>Fonsecaea pedrosoi</i> em campo claro e campo escuro (D); E- Fragmento de hifa da espécie <i>Fonsecaea pugnacius</i> em campo claro e escuro (F). ....	66
Figura 31 - Esquerda: MEV de um filme com nanopartículas de Co, indicando a região em que foi feito o EDS; Direita: resultado da composição na região escolhida. ....	68
Figura 32 - Esquerda: MEV de um filme com nanopartículas de Ni, indicando a região em que foi feito o EDS; Direita: resultado da composição na região escolhida. ....	69
Figura 33 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) – imagens na parte superior. Energia Dispersiva em Raios-X (EDS) – imagens na parte inferior evidenciando a presença das nanopartículas de cobalto (pontos brilhantes) depositadas sobre os fungos. <i>Fusarium oxysporum</i> : A- MEV e B- EDS; <i>Fonsecaea pugnacius</i> : C- MEV e D- EDS; <i>Fonsecaea pedrosoi</i> : E- MEV e F- EDS.....	70
Figura 34 - Microscopia de varredura de amostras de <i>Candida tropicalis</i> evidenciando os subprodutos e estruturas filamentosas que são excretadas na parede do fungo. ....	71
Figura 35 - Imagem dos coloides de nanopartículas (esquerda), do substrato de vidro sobre o ímã com gotas (2 µl) depositadas (centro) e o substrato já seco e pronto para uso, após secagem por 24h.....	72
Figura 36 - Espectro Raman/SERS associado à nanopartículas de Co. ....	73

Figura 37 - moléculas de interesse biológico utilizadas como analitos para verificação de efeito SERS com nanopartículas de Ni, Co e Bi. Prolina (esquerda), Glicina (centro) e Ureia (direita). .....	74
Figura 38 - Espectro Raman da prolina (abaixo, em cinza) em alta concentração e espectros SERS em solução aquosa na presença de nanopartículas de Co, Ni, Bi e Au. ....	75
Figura 39 - Espectro Raman (curva em preto) e SERS da glicina usando nanopartículas de cobalto e os procedimentos “gota-gota” (curva azul) e “gota-substrato” (curva vermelha).....	77
Figura 40 - Espectro SERS da ureia nos experimentos “gota-gota” e “gota-substrato”. Abaixo, o espectro Raman característico da ureia. ....	78
Figura 41 - Espectro SERS da ureia para efeito de comparação: “gota-gota” e “gota-substrato”. .....	79
Figura 42 - Dados SERS dos fungos hialinos: <i>Fusarium sp.</i> , <i>Candida albicans</i> , e negros: <i>Fonsecaea pugnacius</i> e <i>Fonsecaea pedrosoi</i> . ....	81
Figura 43 - Mapa Raman <i>Fonsecaea pedrosoi</i> e <i>Fonsecaea pugnacius</i> , respectivamente. À esquerda: sinal Raman do pico característico do cobalto, em 680 $cm^{-1}$ . À direita: imagem ótica dos fungos. ....	82
Figura 44 - Espectros SERS dos fungos <i>Fusarium spp</i> e <i>Candida albicans</i> com diferentes nanopartículas. Note-se que os espectros apresentam similaridades e também diferenças. As diferenças podem ser utilizadas para diferenciação entre os gêneros.....	84
Figura 45 - (A) Espectros Raman e SERS utilizando nanopartículas de cobalto na linhagem CMRP de <i>Fonsecaea monophora</i> . (B) a amplificação das regiões entre 1000 – 1800 $cm^{-1}$ ....	85
Figura 46 - Espectro Raman e SERS de cinco espécies distintas de <i>Candidas</i> .....	86
Figura 47 - Resultado SERS para amostras de hemocele de tenébrios.....	87
Figura 48 - Resultado PCA para distinção de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i> . ....	88
Figura 49 - Resultado preliminar de PCA para distinção de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida auris</i> . ....	89

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
1.1 Nanotecnologia: o mundo nano, nanopartículas e o efeito SERS	14
1.2 NanoBioFotônica	20
1.3 OBJETIVOS	24
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	25
2.1 Ablação a Laser: produção de nanopartículas	25
2.2. Substratos para SERS	27
2.3 Técnicas de caracterização	30
2.3.1 Caracterização segundo absorção UV-Vis: relação entre plásmon, comprimento de onda e detecção SERS	30
2.3.2 Dynamic Light Scattering (DLS): tamanho e forma	31
2.3.3 Perfilometria: a dimensão das superfícies	32
2.3.4 Microscopia de Força Atômica ( <i>Atomic Force Microscopy</i> – AFM):	34
2.3.5 Microscopia de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM): visualizando o mundo nano	36
2.4 Fungos	38
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	43
3.1 A síntese de nanopartículas por ablação a laser	43
3.2 UV-Vis, DLS, AFM e Perfilometria	44
3.3 MEV e EDS	48
3.4 TEM	48
3.5 Substratos SERS	49
3.6 Espectroscopia Raman/SERS	50
3.7 Fungos	53
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	55
4.1 As nanopartículas sintetizadas	55
4.2 UV-Vis, DLS	56
4.3. AFM e Perfilômetro	59
4.4 TEM	64
4.5 Composição estrutural e relação nanopartícula/microrganismos (MEV e EDS)	67
4.5. Substratos SERS	71
4.6. Espectroscopia RAMAN/SERS	72

<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	91
5.1. Trabalhos Futuros.....	92
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	94
<b>ANEXOS</b> .....	103
Publicações .....	103

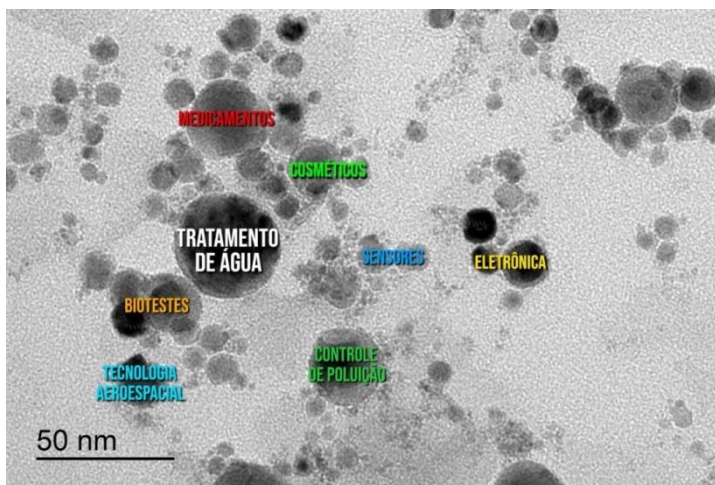
## 1 INTRODUÇÃO

O capítulo dará um contexto dos históricos de pesquisa que levaram ao desenvolvimento desse trabalho, além das motivações acadêmicas, científicas, pessoais e sociais que permearam todo o projeto.

### 1.1 Nanotecnologia: o mundo nano, nanopartículas e o efeito SERS

Historicamente, existem muitos registros da influência da tecnologia na revolução da civilização humana. Desde a invenção da roda até o desenvolvimento das impressoras, as revoluções tecnológicas têm contribuído significativamente para a melhoria da qualidade de vida e levado às transformações sociais (LINDSAY, 2010; MURTY *et al.*, 2013). A nanotecnologia se enquadra nesse sentido pelo seu impacto em larga escala em diversos setores como representado na Figura 1.

Figura 1- Potencial de aplicação da nanotecnologia em diversos campos.

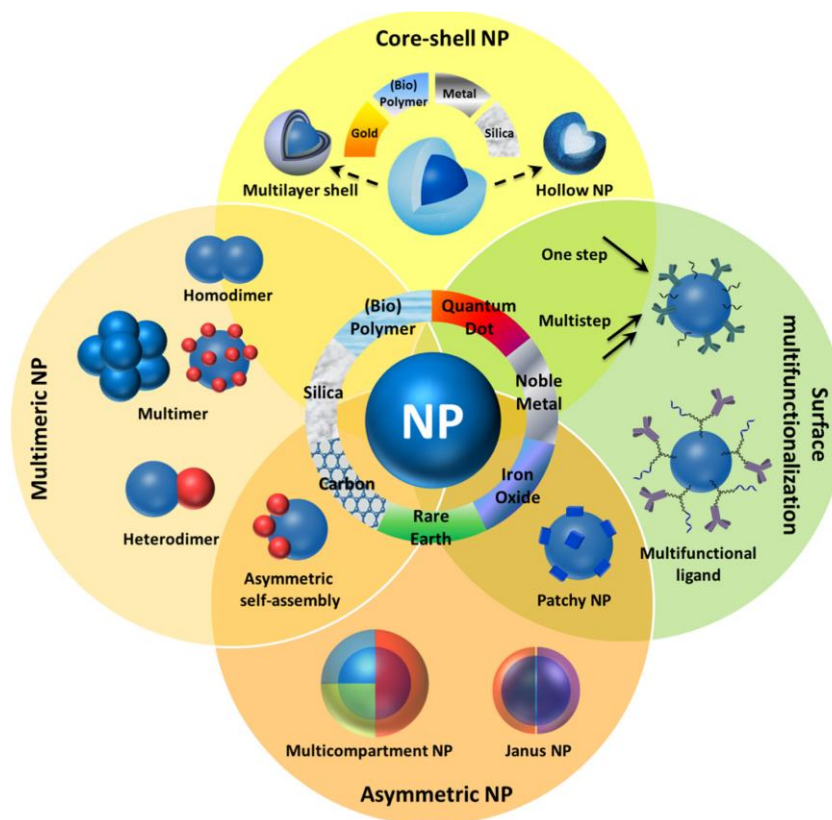


Fonte: A autora (2020)

Uma das dimensões da nanotecnologia que é amplamente estudada são as nanopartículas. Há uma vasta gama de possibilidades associadas, incluindo diferentes materiais, mecanismos de síntese, variados formatos e tamanhos, funcionalização de superfície, dentre outros, que implicam em uma grande diversidade de propriedades

físico-químicas e potencialidades de uso em aplicações tecnológicas. Na Figura 2, é apresentado um esquema ilustrativo de algumas potencialidades de nanopartículas: diferentes materiais (metais nobres, terras raras, carbono, etc.); diferentes composições de nanopartículas (formando dímeros e associações diversas); nanopartículas ocas ou com revestimentos (*core-shell*); nanopartículas com superfície funcionalizada (por meio de ligantes como anticorpos, por exemplo); e nanopartículas assimétricas.

Figura 2 – Possibilidades de composição e funcionalização de nanopartículas.



Fonte: G. De Crozals et al. (2016)

A evolução da ciência médica, assim como das ciências de base como física, química e biologia vivenciaram grandes avanços, particularmente a partir do século XX, com o advento da mecânica quântica, das modernas técnicas de síntese química e com a biologia molecular, por exemplo, dando origem a áreas de pesquisa inter e multidisciplinares, de tal forma que foi possível criar, produzir, desenvolver e viabilizar

sistemas que antes poderiam ser tomados como mágica ou sonhos impossíveis: imagine-se, por exemplo, o sequenciamento do genoma humano, o desenvolvimento do laser, a produção em massa de vacinas e de antibióticos. A emergência da nanotecnologia constitui, de fato, um exemplo deste avanço, porque se trata de um campo que envolve todas as ciências e constitui uma tecnologia transversal, disruptiva e pervasiva (MCTIC, 2020). Uma aplicação importante da nanotecnologia é justamente na área da saúde (PRASAD, 2004a, 2004b; SAHOO, 2007; KAUSHIK, 2019). Ainda assim, apesar de todo o avanço científico e tecnológico, de acordo com os relatórios de 2018 da OMS (Organização Mundial da Saúde), mais 8,8 milhões de pessoas morrem por serem acometidas por doenças que tem diagnóstico tardio ou dificuldade para determinação e início de tratamento, especialmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (OMS, 2020).

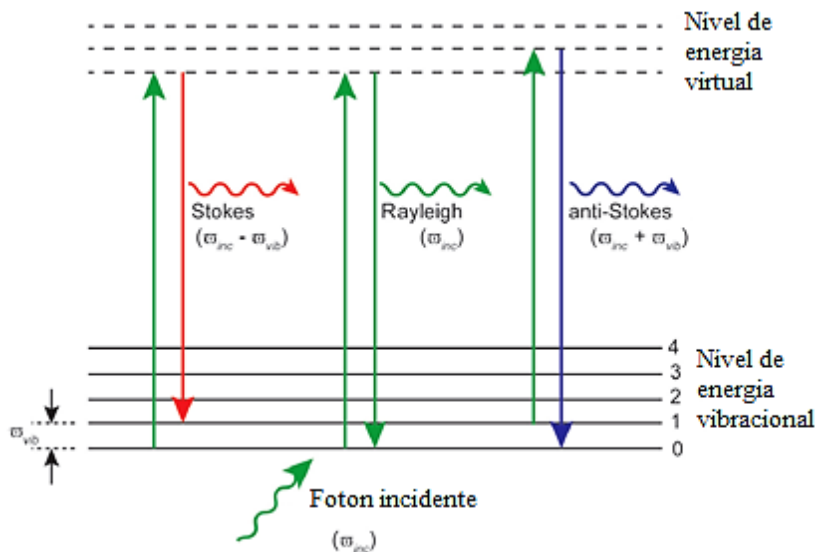
A utilização de nanopartículas em tecnologias para a biologia e a medicina pode ser um possível caminho para o desenvolvimento de alternativas mais acessíveis e com potencial de serem implementadas em diversas áreas da saúde (PRASAD, 2004a, 2004b; SALATA, 2004). Para isso, um dos aspectos importantes é a possibilidade de produzir nanopartículas em larga escala e de forma que estas sejam acessíveis aos experimentos e projetos na área. Por isso, a fabricação de nanopartículas por ablação a laser em líquidos tornou-se um recurso interessante e uma técnica importante para muitas aplicações, incluindo as áreas de ciências biológicas e saúde. As partículas geradas a laser são muito úteis para amplo uso em dispositivos médicos, materiais fotônicos, catalisadores e muito mais (BARCIKOWSKI, 2016). Essas partículas, quando em escala nanométrica, são a base, por exemplo, para os substratos SERS, que é tema desta dissertação. SERS é o acrônimo de *Surface Enhanced Raman Scattering* (ou *Spectroscopy*), que, em português, traduzimos por Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (LANGER, 2019).

O espalhamento Raman é o espalhamento de fótons que possuem diferentes frequências, comparadas com o fóton incidente que atinge o analito. Em resumo, trata-se de fazer incidir luz em uma amostra e coletar a luz espalhada. Esta luz espalhada é composta por uma componente (dominante) que tem a mesma frequência da luz



incidente (espalhamento *Rayleigh*) e outras componentes (em menor intensidade) que apresentam frequências maiores e menores. Estas diferenças de frequência estão associadas à interação da luz com os componentes moleculares do analito. A interação consiste em trocas de energia entre a luz e o material. Então, devido às vibrações e rotações específicas das moléculas do analito, o espectro Raman é único e pode ser utilizado para identificação do material e mapeamento de estruturas, para identificação de componentes moleculares constituintes do analito, por exemplo (SMITH, 2019). Entretanto, são necessárias muitas moléculas ativas para obter o efeito Raman, pois apenas uma fração muito pequena dos fótons incidentes, responde ao espalhamento (inelástico), assim, o sinal Raman é muito fraco e isso pode gerar dificuldade para detecção.

Figura 3- Representação dos conceitos de espalhamento Rayleigh, Stokes e anti-Stokes quando há um fóton incidente com frequência  $\omega_{inc}$  interagindo com uma molécula da amostra com frequência vibracional  $\omega_{vib}$ . No caso do espalhamento Stokes a molécula absorve energia espalhada, enquanto no anti-Stokes, a molécula perde energia e resulta em um aumento da energia espalhada.



Fonte: Bora (2018)

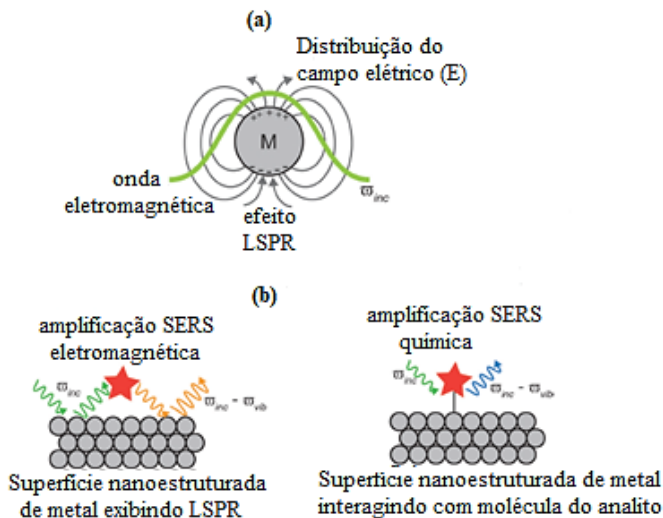
O SERS amplia o espalhamento Raman com fatores de aumento muito altos, podendo ser até  $10^{12}$  vezes, o que permite aumento tanto quantitativo quanto qualitativo da detecção de moléculas e bioanalitos (BORA, 2018), inclusive possibilitando a

detecção de uma única molécula (BORA, 2018; LANGER, 2019), daí o potencial de utilização deste efeito em sensores e biossensores.

Para que haja efeito SERS, é necessário que a luz incida no analito em presença de alguma nanoestrutura, por exemplo, um conjunto de nanopartículas. Dois mecanismos para a ampliação do espalhamento Raman via nanoestruturas (que recebem a denominação “plasmônicas”) são amplamente aceitos: o efeito químico e o aumento eletromagnético. O aumento eletromagnético acontece devido à interação com os modos de oscilação de plásmos de superfície (*surface plasmon resonance* - SPR, ou *longitudinal surface plasmon resonance* – LSPR) característicos da nanopartícula (ou nanoestrutura). Este processo implica em uma amplificação ou “concentração” da luz incidente, criando um campo eletromagnético local intenso (BORA, 2018; SMITH, 2019; LANGER, 2019). Devido ao SPR de múltiplas nanopartículas forma-se o que se chama *hot spots* e assim o sinal SERS é então aumentado.

Dentro desse contexto, a plasmônica é um campo promissor na ciência e tecnologia, explorando a interação entre a luz e a matéria através da ressonância de superfície plasmônica (SPR), com aplicações em uma ampla gama de disciplinas incluindo fotônica, química, energia e ciências da vida. A SPR consiste na oscilação coletiva de um campo eletromagnético induzido de cargas agregadas na interface entre materiais como os dielétricos e metais. A rigor, a amplificação do campo elétrico tem uma componente ressonante associada à SPR e também uma contribuição devida à geometria (conhecida como *lightning rod effect*). Além disso, existe uma componente “química” associada a interações específicas entre analito e nanoestruturas, mas cuja contribuição é diversas ordens de grandeza menor que o efeito de aumento de campo elétrico (MAIER, 2007). Na Figura 4, é apresentada uma ilustração esquemática para representar estes efeitos. Em geral, nanopartículas metálicas coloidais possuem bandas de absorção ou ampla região de absorção de luz na faixa ultravioleta-visível-infravermelho. Isso depende das características e propriedades específicas dos metais que constituem a nanopartícula. Portanto, a absorção intensa de luz ou espalhamento pelas nanopartículas metálicas são os fundamentos do efeito SERS, que constitui uma ferramenta muito importante para aplicações biomédicas.

Figura 4 - (a) ilustração do efeito LSPR em uma nanopartículas de metal na presença de uma onda eletromagnética com frequência  $\omega_{inc}$  com frequência de plasmon ressonante. (b) mecanismo de amplificação SERS eletromagnética (esquerda) e químico (direita).



Fonte: Bora (2018)

As pesquisas em plasmônica, especialmente relacionadas ao efeito SERS, abordam geralmente a descrição da utilização de metais nobres como ouro, prata e, com menos intensidade, cobre. Por outro lado, pesquisas mais recentes têm mostrado uma gama maior de metais que exibem ampliações de campo elétrico comparáveis aos metais nobres. Por exemplo, os ditos “metais pobres”, tais como alumínio (Al), gálio (Ga), índio (In), antimônio (Sn), titânio (Ti), chumbo (Pb) e bismuto (Bi), apresentam ressonâncias de plásmom na região do ultravioleta (BEZERRA, 2017; 2018). Além disso, os metais de pós-transição In, Sn, Pb e Bi e o metaloide Sb foram testados para SPR e SERS, indicando fatores de aumento de campo elétrico comparáveis aos obtidos com nanopartículas de ouro (BEZERRA, 2018). Portanto, desenvolver pesquisas que permeiam a síntese e caracterização de nanopartículas que possuam os efeitos plasmônicos para SERS configuram um campo de pesquisa importante.

Quando se entende que a física seja uma ciência de base, fundamental para todas as áreas, uma vez associada com a biologia, química e medicina pode possibilitar, em conjunto, o desenvolvimento de sensores para, por exemplo, a

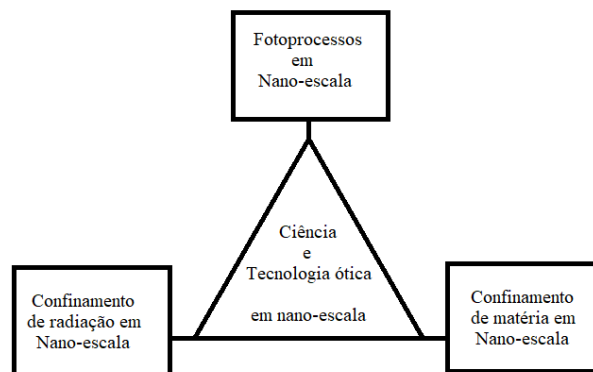
realização de diagnósticos. Estes sensores podem ser do tipo *label-free*, *point-of-care*, com baixo custo e potencial de produção em larga escala para aplicações em saúde. Esta ideia inspira e dá fundamento a proposta do presente trabalho.

## 1.2 NanoBioFotônica

A biofotônica pode ser definida como as interações entre a luz e a matéria biológica. Isto é uma fronteira que envolve a fusão da fotônica e da biologia, o que oferece possibilidades para diagnósticos mais rápidos para doenças e uma nova modalidade de terapias baseadas em estímulos luminosos (PRASAD, 2004b).

A nanofotônica, por sua vez, trata da interação entre luz e matéria, em escala nanométrica, adicionando assim uma nova dimensão na escala “nano” da ciência e da tecnologia, que promove desafios para pesquisas de base fundamental e cria um ambiente propício para o desenvolvimento de novas tecnologias (PRASAD, 2004a). A nanofotônica pode ser caracterizada e dividida conforme o exibido na Figura 5 (SHEN *et al.*, 2000).

Figura 5- Nanofotônica organização de escala.

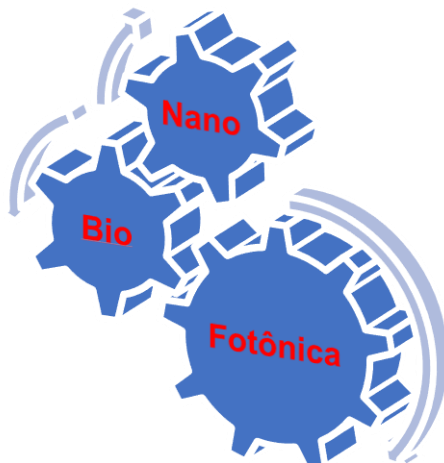


Fonte: A autora (2020)

Quando levamos a biofotônica para escalas muito pequenas, como a nano, ou, quando a nanofotônica é utilizada para aplicações em biologia, emerge um campo interdisciplinar caracterizado pelo termo relativamente novo “nanobiofotônica”

(PRASAD, 2004a, 2004b), tendo uma dependência mútua da biologia, nanotecnologia e fotônica como indica a Figura 6.

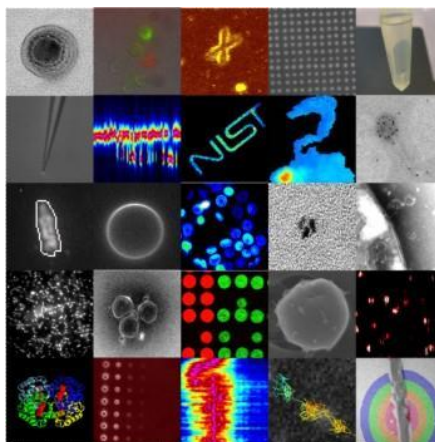
Figura 6 - Representação da NanoBioFotônica.



Fonte: A autora (2020)

A NanoBioFotônica pode ser dividida em quatro grandes áreas: bioimagem molecular (conforme a Figura 7); nanobiossensores; bioensaios multiplexados; e práticas médicas baseadas em nanotecnologia para diagnóstico e terapia (NIST, 2020).

Figura 7 - Algumas imagens em nível molecular (fragmentos de DNA), celular (bactérias) e também em tecidos (epitelial) como aplicações da NanoBioFotônica.



Fonte: NIST (2020)

Uma das possibilidades de sensoriamento são os novos métodos práticos de diagnóstico de doenças, constituindo assim uma alternativa à detecção de um

determinado composto, molécula ou microrganismo sem a necessidade de marcação utilizando outros materiais como, por exemplo, enzimas ou anticorpos. Esta é a abordagem do tipo *label-free* que, ao eliminar a necessidade de “etiquetas” e, conseqüentemente, algumas etapas do processamento de amostras associadas, a detecção pode ocorrer com a mínima ou nenhuma intervenção do usuário, além de fornecer os resultados mais rapidamente. A combinação da capacidade de detecção e simplicidade fornecida por este método pode trazer benefícios notórios para o diagnóstico de doenças, além de reduzir também os custos da análise, que implica numa maior abrangência de pessoas de diferentes estratos socioeconômicos capazes de usufruir do método (VELTRONI, MOURA E CASTRO, 2020).

Conforme discutido anteriormente, para os sensores plasmônicos há a necessidade de utilizar nanoestruturas ou nanopartículas. Nos sensores mais simples, baseados em espalhamento Rayleigh, a sensibilidade imediata das nanopartículas ao ambiente dielétrico permite monitorar a constante dielétrica de líquidos e eventos de ligação de moléculas na superfície dessas partículas. Com isso, ao incidir luz, são esperadas mudanças no espectro incidente, que dependem da quantidade de analito. Este produz uma alteração do índice de refração do ambiente, que é detectável. Os pioneiros nesse modelo de sensor utilizaram inicialmente nanopartículas esféricas de ouro (RASCHKE *et al.* 2003; MCFARLAND e VAN DUYNE 2003), mas logo fizeram a substituição por *nanorods* (pequenos bastões) de ouro, devido à sua maior sensibilidade nas alterações do índice de refração (LEE E EL-SAYED, 2006).

De fato, a sensibilidade de sensoriamento depende da constituição e tamanho das partículas (BECKER, 2012). Para aplicações de detecção, a largura espectral e a mudança da ressonância de plásmon são importantes para que haja boa resolução (SHERRY *et al.* 2005). Contudo, sensores baseados em espalhamento Rayleigh necessitam, em geral, de funcionalização das nanopartículas. No caso do presente trabalho, optou-se pela espectroscopia Raman/SERS por conta do potencial desta técnica para a detecção e diferenciação de espécies moleculares específicas.

No caso das células e tecidos, estes são caracterizados por uma composição bioquímica dinâmica e estrutura molecular específica. De maneira semelhante, cada

patologia ou anormalidade celular é acompanhada de alterações bioquímicas e moleculares, que também podem ter uma natureza dinâmica (por exemplo, uma célula cancerosa progride para um sistema vascularizado e assim se espalha). Nesse caso, há necessidade do desenvolvimento de um sistema óptico ou de técnicas, espectroscópicas, por exemplo, que serão as ferramentas capazes de correlacionar a composição bioquímica, estrutura molecular e suas variações, com o diagnóstico. Essa descrição encaixa perfeitamente com as potencialidades da espectroscopia Raman que, além de atender a esses requisitos, possui várias vantagens exclusivas como: fornecer a impressão digital específica das moléculas; permitir obter a informação por meio de diferentes comprimentos de onda (que estão associados aos equipamentos disponíveis e podem ser adequados a cada tipo de amostra); possibilitar o ajuste dos equipamentos de tal forma que não se prejudique as amostras biológicas *in vitro* e *in vivo*; realizar mapeamentos, por exemplo, de tecidos, com resolução micro e até nanométrica; e, no caso do uso de fibras óticas, aplicação invasiva mínima durante procedimento e exames como a endoscopia. (Raman4clinics, 2020).

Foi unindo propostas e ideias da nanobiofotônica, as possibilidades de sensoriamento e o foco na produção de ferramentas de diagnóstico que foi criado o “Raman4clinics”. Tendo em vista o potencial das técnicas baseadas em Raman nos diagnósticos clínicos, a iniciativa “Raman4clinics” promove a colaboração entre grupos de pesquisa estabelecidos, envolvendo biólogos, físicos, químicos, engenheiros e médicos/clínicos. Isso, para avançar no campo de diagnósticos clinicamente relevantes, praticáveis e economicamente viáveis, estabelecendo uma série de novas tecnologias baseadas na espectroscopia Raman, incluindo SERS (Raman4clinics, 2020).

A ação formou uma rede colaborativa com pesquisadores europeus que trabalham para o progresso do campo emergente das técnicas de Raman para a avaliação, por meio de espectroscopias vibracionais, de fluidos corporais, patógenos, células e tecidos e sua tradução para a prática clínica, visando à produção de tecnologias de saúde para sensores e diagnóstico clínico (Raman4clinics, 2020). De certa maneira, o grupo FotoNanoBio tem buscado inspiração nesta iniciativa. Parte dos trabalhos desenvolvidos tem por objetivo construir um núcleo local (em Curitiba, a partir

da UTFPR) para o desenvolvimento de ciência e tecnologia baseada em Raman/SERS aplicada à saúde. Esta ideia inspira os resultados que serão apresentados nos capítulos que seguem.

### 1.3 OBJETIVOS

A dissertação está dividida nos seguintes capítulos: capítulo 1, introdução; capítulo 2, revisão da literatura; capítulo 3, metodologia utilizada; capítulo 4, resultados obtidos; e capítulo 5, considerações finais.

O objetivo geral desse trabalho foi produzir nanopartículas de Ni, Co e Bi para a obtenção de efeito SERS, tanto em meio aquoso quanto em substratos, visando à detecção de moléculas de interesse biológico e à detecção e diferenciação de microrganismos, particularmente fungos.

#### Objetivos específicos:

1. Produzir e caracterizar nanopartículas de Ni, Co e Bi;
2. Produzir substratos SERS com as nanopartículas;
3. Utilizar os coloides e substratos em experimentos SERS para a detecção de prolina, glicina e ureia;
4. Utilizar os coloides e substratos em experimentos SERS para a detecção e diferenciação de fungos.
5. Comparar os resultados dos experimentos SERS utilizando nanopartículas de Ni, Co e Bi com aqueles obtidos utilizando nanopartículas de metais nobres;
6. Comparar os resultados SERS obtidos por meio dos substratos com os obtidos por meio dos coloides (técnica gota/gota).



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As páginas que seguem contextualizam, explicam e exemplificam detalhes da fundamentação teórica em que esse trabalho se baseou, assim como apresentam uma sessão especial sobre a importância dos microrganismos e moléculas que estiveram no conjunto de testes propostos.

### 2.1 Ablação a Laser: produção de nanopartículas

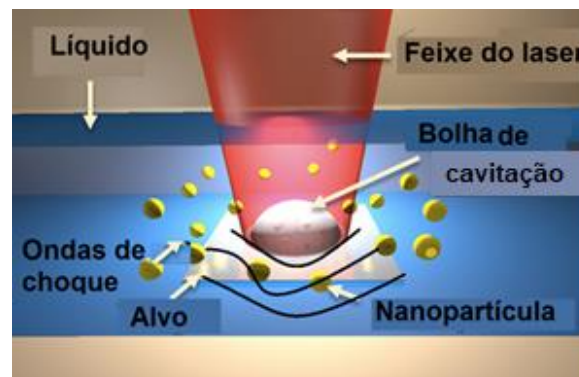
Não há apenas uma maneira de se obter nanopartículas (BARCIKOWSKI *et al.*, 2016). As mais comuns são a ablação (descrita nas linhas que seguem) e a síntese química, ambas com suas respectivas vantagens e desvantagens.

Duas décadas após a geração das primeiras nanopartículas coloidais com laser, mais de 350 institutos em todo o mundo estão ativamente envolvidos na síntese e processamento de nanopartículas por ablação a laser. Se três estudantes por instituto trabalhassem nesse campo, haveria um total de 1000 estudantes com potencial para ingressar na academia ou na indústria usando esse método baseado em laser (BARCIKOWSKI *et al.*, 2016). Diferentes terminologias como “ablação / fragmentação / derretimento a laser pulsado em líquidos (*Pulsed Laser Ablation in Liquid* - PLAL, *Pulsed Laser Fragmentation in Liquid* - PLFL, *Pulsed Laser Melting in Liquid* - PLML)” ou “Síntese por Ablação a Laser em Solução (*Laser Ablation Synthesis in Solution* - LASiS)” são usadas para descrever o processo (AMENDOLA *et al.*, 2009; 2013; ZENG *et al.*, 2012; BARCIKOWSKI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

Lasers são ferramentas poderosas que podem ser usadas no processamento de materiais se o feixe for direcionado com conveniente comprimento de onda, duração temporal e densidade de energia para uma superfície. Como resultado da irradiação sobre um alvo, pode ocorrer o desgaste do material, que pode ser explorado para síntese de partículas. Uma ideia interessante, especialmente porque a técnica foi originalmente usada com objetivo de estruturar a superfície do alvo, de modo que as partículas removidas eram inicialmente consideradas “apenas desperdício” por um

longo tempo. Focando um feixe de laser em um alvo submerso em um volume de líquido, podem-se capturar os materiais resultantes da ablação (do latim “ablatio” significa “ação de tirar”) diretamente no solvente. Isso torna a síntese de partículas mais segura, porque não há poeira fina ou partículas dispersas no ar, então não há resíduos, diminuindo assim riscos à saúde e ao meio ambiente e doenças respiratórias. Mas o mais importante, os coloides são mais fáceis e mais seguros para processar produtos valiosos como ouro e prata, do que nanopós filtrados pelo estágio gasoso, por exemplo. O líquido no qual se dá a ablação é uma das chaves para a qualidade e o valor da síntese (BARCIKOWSKI *et al.*, 2017). Na Figura 8, é apresentado um diagrama esquemático do processo de ablação a laser.

Figura 8 - Esquema de ablação a laser. Um feixe de laser interage com um material alvo, levando à formação de plasma (não mostrado) e bolha de cavitação (mostrado aqui em seu tamanho inicial) no qual a matéria “ablada” condensa. Após o colapso da bolha de cavitação, as nanopartículas são dispersas no líquido.



Fonte: Zhang, Gökce e Barcikowski (2017)

Considerando os princípios da ablação a laser em líquidos, a formação de nanopartículas pode ocorrer por vários mecanismos, que são influenciados por diferentes parâmetros do laser (como duração do pulso, comprimento de onda, energia, taxa de repetição) e materiais-alvo envolvidos. Quando um laser irradia um material de estado sólido submerso em um meio líquido, a energia fornecida pelo pulso do laser é absorvida pelo alvo e leva à formação de uma explosão caracterizada inicialmente por uma pluma de plasma (uma mistura de elétrons e íons) em expansão contendo o material “ablado” (Figura 8). Isto é acompanhado pela emissão de uma onda de choque

que libera energia no líquido circundante. Quando o plasma esfria, troca calor com o líquido, que é transformado em vapor quente. Isso leva à formação de uma bolha de cavitação oscilante contendo tanto a matéria “ablada” quanto o vapor líquido, ambiente em que ocorre a formação de partículas. Após o colapso da bolha de cavitação, outra onda de choque é gerada e as partículas são finalmente libertadas no solvente. No caso de soluções aquosas, para materiais como ouro ou zinco, a estabilização eletrostática da partícula é então alcançada devido a superfícies parcial ou totalmente oxidadas e formação de uma camada eletrizada. Por este método, uma variedade de nanomateriais pode ser obtida em diferentes solventes, o que abre uma ampla gama de aplicações (AMENDOLA *et al.*, 2009; 2013; ZENG *et al.*, 2012; BARCIKOWSKI *et al.*, 2016; ZHANG *et. al.*, 2017).

## 2.2. Substratos para SERS

O desenvolvimento de substratos SERS constitui importante campo de pesquisa na atualidade. Diversas técnicas têm sido empregadas, incluindo automontagem para imobilizar nanopartículas metálicas, técnicas de nanolitografia, e criação de padrões baseados em *templates* (FAN, 2011). São estudados ainda diversos materiais, formas e funcionalização de estruturas (LI, 2017; HUANG, 2018). Dada a possibilidade de aplicações da espectroscopia SERS, também é importante que os substratos possam ser fabricados em escala, portanto, há projetos que buscam a produção usando soluções de baixo custo, por exemplo, em papel (CHAMUAH, 2017) e inclusive explorando as potencialidades da ablação a laser (HERRERA, 2013). Além dessas, outro desafio é a produção controlada de *hot spots*, ou seja, as regiões em que ocorrem os enormes aumentos de campo elétrico, nos quais se dá a amplificação do sinal Raman das moléculas, ou seja, o efeito SERS (WANG, 2018).

A eficiência do sinal SERS depende da interação entre a molécula estudada e o substrato nano-estruturado. Dessa forma, a preparação dos substratos SERS é fundamental para o sucesso da técnica, sendo que a contribuição da amplificação eletromagnética é dependente do tamanho, formato e estrutura do material usado. Os

metais nobres são mais comumente utilizados para essa função devido às suas propriedades plasmônicas. Etchegoin *et. al* (2007) demonstram, por exemplo, que a eficiência dos *hot spots* pode ser alterada pela variação da forma das nanopartículas coloidais.

Esses substratos, enquanto ferramentas para análise molecular, conduzem a amplas aplicações práticas em diferentes áreas, por exemplo: identificação de corantes em tintas; detecção de aditivos e conservantes em alimentos, para segurança alimentar; detecção de poluentes ambientais; detecção de explosivos e materiais de interesse em ciências forenses, inclusive substâncias ilícitas; e as aplicações em biomedicina e saúde. Substratos SERS de estado sólido e substratos com coloides de nanopartículas sintetizados quimicamente têm sido utilizados nessas áreas e mostraram vantagens sobre testes Raman convencionais em termos de alta sensibilidade, baixa exigência de quantidade de amostra necessária e baixo custo. Atualmente, a comercialização dos substratos SERS de, por exemplo, ouro ou prata e o desenvolvimento de instrumentos portáteis de detecção Raman de mão tornam o método SERS muito mais fácil e prático para uma série de aplicações (MOSIER-BOSS, 2017).

O efeito SERS é usado em biomedicina e diagnósticos, como detecção biomolecular, detecção de células de câncer, imunoproteínas e bactérias, imagens médicas e pesquisa farmacêutica como uma ferramenta eficaz de detecção devido à sua vantagem sobre métodos de detecção convencionais (NIMA *et al.*, 2014). Substratos com coloides de ouro ou prata são mais comumente usados (POWELL, VENKATAKRISHNAN e TAN, 2016; AKIN *et al.*, 2014).

Powell *et al.* (2016) desenvolveram um novo substrato híbrido aproveitando efeitos de transferência de carga para a detecção de moléculas como biomarcadores. A nanoestrutura híbrida consiste em nano-esferas de ouro produzidas por síntese química e uma substância amorfa de silício cristalino. A presença de nanopartículas de ouro sustenta o aumento plasmônico e a interação específica entre o silício e a molécula a ser detectada, por meio de transferência de carga, fazem com que ocorra aprimorando do espalhamento Raman. Explorando a funcionalização dos substratos, Aparentado *et al.* (2014) introduziram um revestimento de poli dopamina bio-inspirado e galvanização

a um substrato com nanofios de silício fabricado por ataque catalítico metálico para a detecção de azul de metileno. Por sua vez, Garrett *et al.* (2015) usaram asas de borboleta revestidas com ouro como substratos plasmônicos para a detecção do parasita da malária. Comparado com o custo típico dos substratos SERS artificiais, as nanoestruturas na superfície das asas de borboleta reduziram o custo total de fabricação.

A partir da revisão da literatura, percebe-se que um dos fatores que influencia significativamente a eficiência do sinal SERS é a homogeneidade da existência de *hot spots* no substrato de nanopartículas. Isso se dá porque a distribuição das nanopartículas, assim como seus respectivos tamanhos, é responsável pela criação de *hot spots* homogeneamente espalhados no substrato (FAN, ANDRADE e BROLO, 2011). Note-se que este ainda é um assunto em aberto e motivo de diversos estudos ainda em andamento.

Os coloides são excelentes possibilidades para produção de substratos SERS, uma vez que a agregação de partículas metálicas leva à formação de agrupamentos com a rugosidade e morfologia fractal necessária para produzir espectros Raman intensos (ALBRECHT E CREIGHTON, 1977; SANCHEZ-GIL E GARCÍA-RAMOS, 1998) e podem ser preparados com alta reprodutibilidade. Além disso, eles são relativamente baratos e possibilitam forjar superfícies coloidais disponíveis para análises SERS reprodutíveis e confiáveis, constituindo assim uma alternativa possível para múltiplas análises (BAIA, ASTILEAN E ILIESCU, 2008).

Dentre as suspensões coloidais metálicas mais comuns, incluindo ouro, prata e cobre, o uso da prata ainda é destaque nos substratos SERS. Entre os métodos empregados para obter coloides de metal, a redução química (nitrito de prata com citrato) produz uma distribuição mais uniforme de tamanhos de nanopartículas (LEE e MEISEL, 1982). A propósito, a intensidade de SERS parece aumentar à medida que as nanopartículas de prata apresentam diâmetros médios de cerca de 50 nm (RIVAS *et al.*, 2001). No entanto, um aumento adicional do tamanho das partículas, entre 100 nm e 130 nm leva a um sinal SERS de intensidade mais baixa. Se a nanoestrutura para SERS se torna muito pequena, como resultado de processos de espalhamento

eletrônico na superfície, a ressonância dipolar plasmônica se altera e a intensidade do campo irradiado é reduzida (MOSKOVITS 2005; BAIA, ASTILEAN e ILIESCU 2008). Por outro lado, o limite dimensional superior é determinado pelo comprimento de onda, então quando as nanopartículas têm tamanhos relativos da ordem do comprimento de onda da luz incidente ou maior, são usados os campos ópticos para excitar multipolos de ordem progressivamente mais alta que não são radioativos e, portanto, não são eficientes para o efeito Raman (MOSKOVITS 2005; BAIA, ASTILEAN E ILIESCU 2008). Assim, uma das vantagens dos coloides de metal é a possibilidade de controlar e modificar o tamanho e a forma das partículas, escolhendo condições experimentais adequadas (AHMADI *et al.*, 1996).

Portanto, no caso do presente trabalho, as nanopartículas são empregadas na produção de substratos tendo em vista maximizar o aumento plasmônico do sinal Raman e, assim, possibilitar a detecção de analitos de interesse: moléculas biológicas e microrganismos. Para isso, os coloides sintetizados por ablação a laser devem ser caracterizados a fim de que se conheçam as distribuições de tamanho das nanopartículas e suas características plasmônicas (SPR).

## 2.3 Técnicas de caracterização

### 2.3.1 Caracterização segundo absorção UV-Vis: relação entre plásmon, comprimento de onda e detecção SERS

O espectrômetro UV-vis é um equipamento que permite analisar a luz espalhada, absorvida e transmitida por um material para posteriormente projetar graficamente um espectro. No caso dos coloides com nanopartículas, costuma-se apresentar os espectros de absorção ou, mais apropriadamente, de extinção. O princípio de funcionamento está pautado na quantidade de luz absorvida, utilizando a densidade óptica (ou absorvância), para isso utiliza-se a expressão:

$$A_{\lambda} = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (1)$$

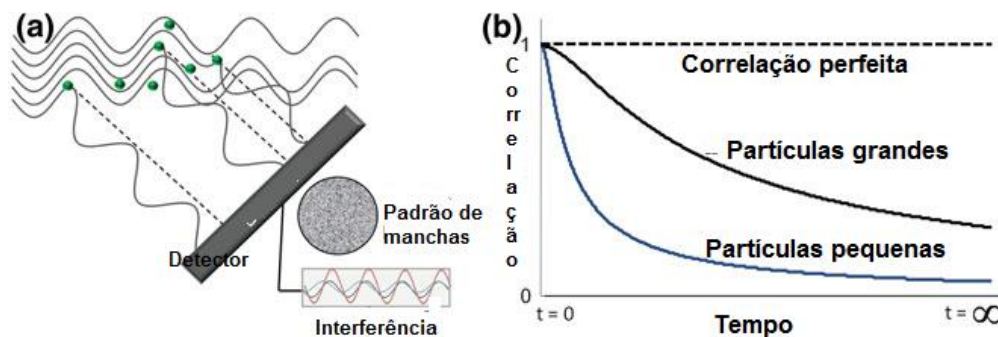
Sendo  $I$  a intensidade da luz transmitida no comprimento de onda ( $\lambda$ ) e  $I_0$  a intensidade incidente.

Esses dados são fundamentais para verificar quais serão os comprimentos de onda de ressonância para cada material, de acordo com os plásmons de superfície de cada amostra. Isso porque, no caso do efeito SERS, o plásmon é característico de cada nanomaterial e possibilita fazer uma alusão para identificar em qual comprimento de onda aquele material terá uma resposta mais intensa quando associado a um determinado analito.

### 2.3.2 Dynamic Light Scattering (DLS): tamanho e forma

O raio hidrodinâmico das nanopartículas pode ser determinado usando um processo chamado espalhamento dinâmico de luz (DLS). Este procedimento mede a constante de difusão do movimento browniano e relaciona isso com o tamanho da partícula, usando a relação de dependência desse movimento com o tamanho da partícula (quanto maiores as partículas, mais lentamente elas se movem). Na Figura 9 é apresentado um diagrama esquemático do funcionamento do DLS.

Figura 9 - Esquema de interação da luz com as nanopartículas coloidais em movimento Browniano, fundamento da técnica de DLS. (a) A luz espalhada produz padrões de interferência variáveis no tempo. (b) Estes padrões obedecem a uma função de correlação que pode ser associada a um modelo matemático do qual se pode determinar a distribuição de tamanhos das nanopartículas.



Fonte: Barcikowski (2017)

Na prática, um laser ilumina a amostra e a luz é espalhada pelas partículas. Como muitas partículas são iluminadas ao mesmo tempo, a luz dispersa interfere e, portanto, um padrão de manchas aparecerá (Figura 9a), sendo possível a detecção desta luz em função do tempo. Como as partículas estão constantemente em movimento, esse padrão de interferência muda com o tempo, sendo caracterizado por uma “função de correlação” que pode ser associada a um modelo matemático, o qual, em última análise, possibilita a determinação do tamanho das nanopartículas. Se o sinal de intensidade do padrão de manchas for continuamente registrado, a análise por uma função de correlação revela a velocidade de difusão das partículas (Figura 9b). O movimento browniano pode ser descrito pela constante de difusão  $D_H$ , que pode ser calculada através da equação de Stokes-Einstein, de acordo com (EINSTEIN, 1905 *apud* BARCIKOWSKI, 2017):

$$D_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

Sendo  $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} [\frac{J}{K}]$ , a constante de Boltzman, T a temperatura,  $\eta$  a viscosidade do solvente e  $r$  o raio da partícula. Portanto, para um dado meio líquido e uma dada temperatura, a técnica de DLS possibilita a determinação (indireta) do tamanho – ou da distribuição de tamanhos – das nanopartículas.

Com esses dados é possível obter o valor médio do tamanho dessas nanopartículas. Os dados também possibilitam fazer uma análise de razão e proporção para cada valor aproximado medido. Vale ressaltar que, no caso das nanopartículas produzidas via ablação a laser, a dispersão de tamanho costuma apresentar muitos tamanhos distintos (a dispersão de tamanhos é, em geral, grande).

### 2.3.3 Perfilometria: a dimensão das superfícies

Os perfilômetros são equipamentos que fornecem características topográficas das superfícies (XAVIER, 2011). Todos os perfilômetros são constituídos de pelo menos



duas partes - um detector e um estágio de movimentação da amostra. O detector é o que determina onde estão os pontos da amostra e o estágio da amostra é o que a mantém e controla sua posição. Em alguns sistemas, o estágio de amostra se move para permitir a medição, em outros o detector se move e em alguns os dois se movem (NANOSCIENCE, 2020).

Existem dois tipos de perfilômetros: *stylus* (caneta) e óptico. Os perfis gerados pelo modelo de caneta usam uma sonda para detectar a superfície, movendo-a fisicamente ao longo da mesma a fim de obter a altura. Isso é feito mecanicamente com ciclos de respostas que monitoram a força da amostra empurrando-a contra a sonda enquanto ela varre a superfície. Um sistema de resposta é usado para manter o braço com uma quantidade específica de torque, conhecido como 'ponto de ajuste'. As alterações na posição Z do suporte do braço podem ser usadas para reconstruir a superfície (NANOSCIENCE, 2020). No caso do tipo óptico, um feixe de luz é utilizado para fazer a varredura da superfície e imagens de interferência formadas no detector podem ser associadas à topologia da superfície da amostra analisada.

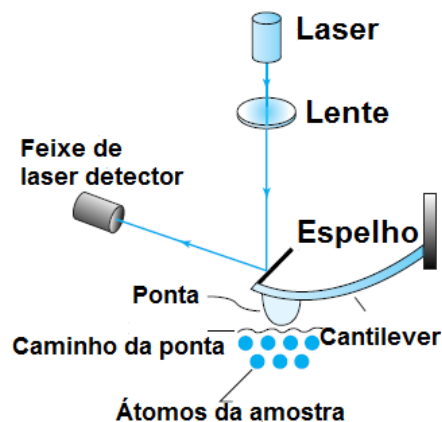
Para formar imagens tridimensionais, um grande número de perfis é calculado ao longo da área ou superfície selecionada, gerando uma imagem em 3D, que são dados obtidos e registrados como uma distribuição de alturas (picos e vales). Estes equipamentos possuem softwares específicos, que permitem a visualização topográfica das superfícies em imagens 3D, fornecem parâmetros matemáticos para identificar as propriedades superficiais das amostras (rugosidade superficial) e possibilitam imagens do perfil (perfilometria) em áreas preestabelecidas (XAVIER, 2011).

Entre os 59 parâmetros de rugosidade citados por Gadelmala (2002), os parâmetros de amplitude são os mais importantes para mensurar as características topográficas, pois caracterizam as irregularidades verticais da superfície. Apesar dos muitos prós, a perfilometria fica limitada quando há mudanças sutis no perfil da superfície.

### 2.3.4 Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy – AFM*):

O AFM (*Atomic Force Microscopy*), ou Microscopia de Força Atômica, baseia-se nas forças interatômicas entre os átomos da ponta (*cantilever*) do microscópio e da amostra, como mostrado na Figura 10. Em alguns sistemas, os átomos da amostra são varridos horizontalmente enquanto a amostra é movida para cima e para baixo para manter constante a força entre os átomos da ponta e da amostra. As forças interatômicas fazem com que o *cantilever* se dobre, ou sofra uma deflexão mecânica, por ser muito sensível. Um feixe de laser é refletido no final do braço do *cantilever* e detectado em um sensor óptico, de modo que o sinal de resposta desse sensor controla a altura da amostra, fornecendo a topografia da superfície, podendo ter precisão de dimensão atômica. A ponta se movimenta, geralmente oscilando, sobre a superfície para haver uma deflexão do *cantilever*, a qual resulta das forças interatômicas entre a ponta e o átomo. A interação entre ponta e amostra é similar a de uma caneta toca-discos movendo-se através do disco, mas é cerca de um milhão de vezes mais sensível. O sistema de resposta óptico impede que a ponta danifique ou distorça os átomos da amostra (THORNTON E REX, 2013).

Figura 10 - Diagrama esquemático do microscópio de força atômica (AFM). Um sinal de resposta da detecção do laser refletindo no espelho que é montado no cantilever fornece um sinal para mover os átomos da amostra para cima ou para baixo para manter a força do cantilever constante. O movimento da ponta traça os contornos dos átomos da amostra.



Fonte: Thornton e Rex (2013)

Os *cantilevers* comumente possuem constantes de mola da ordem de 0,1 N/m e são microfabricados com silício ou compostos de silício. As dimensões laterais do *cantilever* são da ordem de 100 µm com espessuras de cerca de 1 µm. Em comparação a constante de mola de um pedaço de folha de alumínio de 4 mm por 1 mm é de cerca de 1 N/m. As pontas cônicas têm dimensões típicas de dezenas de nanômetros. As forças de rastreamento sentidas pelo *cantilever* podem ser tão pequenas quanto  $10^{-9}$  N (THORNTON E REX, 2013).

A frequência de ressonância do *cantilever* pode ser escrita como:

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (3)$$

Sendo  $k$  a constante de mola e  $m$  a massa. A sensibilidade é aferida de acordo com a deflexão do sinal da fonte, que nos equipamentos mais modernos é um laser (LINDSAY, 2010):

Uma das vantagens do AFM em relação a outras técnicas consiste no fato do AFM funcionar para isolantes e condutores como cerâmica, polímeros, superfícies ópticas e materiais biológicos. No entanto, um isolamento especial de vibrações é necessário para o AFM amortecer as correntes de ar e outras vibrações.

O uso do AFM abre enormes possibilidades para investigação de uma variedade de características da superfície atômica. As imagens topográficas produzidas por este microscópio permitem aos cientistas examinar as características de uma amostra como a rugosidade dos materiais, estruturas de partículas e separação de filmes finos. As aplicações dessa tecnologia incluem as inspeções de bit magnético, topografia de circuito integrado, espessuras de lubrificantes, entre outros e as aplicações biológicas do AFM incluem a imagem de aminoácidos, DNA e proteínas, dentre outras (THORNTON E REX, 2013).

### 2.3.5 Microscopia de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM): visualizando o mundo nano

Como nanopartículas metálicas únicas dispersam a luz com muita eficiência, é possível investigar seu espalhamento usando um microscópio de transmissão convencional no modo de campo escuro. Operando nesse modo, um condensador de campo escuro é colocado no caminho da iluminação, que focaliza a luz no substrato. Usando um condensador com uma abertura numericamente maior que a objetiva, a luz não entra diretamente na objetiva. A abertura numérica N.A. é definida como o intervalo de ângulos sobre o qual o sistema (objetiva ou condensador) pode receber ou emitir luz:

$$NA = n \operatorname{sen}\alpha \quad (4)$$

Onde  $\alpha$  é a metade do ângulo do cone de luz que entra ou sai da lente e  $n$  é o índice de refração do meio em que a lente está operando. Quando os objetos ficam no plano focal de espalhamento de luz, essa luz pode passar pela objetiva e então resultar em uma imagem com pontos brilhantes em um fundo escuro. A seção 4 demonstrará como essa análise funciona na prática.

Quando as nanopartículas investigadas são menores que o comprimento de onda da luz visível, não é possível determinar a forma dessas partículas pela microscopia de campo escuro. Então, um microscópio eletrônico de transmissão (TEM) pode ser usado para investigar as propriedades de tamanho das nanopartículas. No microscópio eletrônico elétrons são utilizados para “iluminar” a amostra, porque têm propriedades de onda, de acordo com de Broglie (DE BROGLIE, 1924):

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (5)$$

Em que  $\lambda$  é o comprimento de onda da partícula [m],  $h$  é a constante de Plank que vale  $6.629 \cdot 10^{-23} \text{ Js}$  e  $p$  é o momento da partícula. A relação entre momento e energia,  $E$ , (a energia devida à diferença de potencial usada para acelerar os elétrons) é dada por:

$$E^2 = (pc)^2 + (m_0c^2)^2 \quad (6)$$

Onde  $c$  é a velocidade da luz e  $m_0$  a massa de repouso do elétron. Em princípio, o TEM funciona de maneira semelhante a um microscópio óptico, mas usando elétrons acelerados em vez de fótons. O comprimento de onda dos elétrons é obtido a partir da Equação 5; para calcular o momento, utiliza-se a equação 9. Lentes magnéticas são usadas para guiar os elétrons. O modo mais comum é o modo de imagem de campo claro, onde os elétrons seguem trajetórias paralelas antes de atingir a amostra. Ao interagir com a região contendo a amostra, os elétrons são espalhados e a imagem aparece escura, enquanto que as regiões sem amostra aparecerão brilhantes. O número de elétrons dispersos e absorvidos depende da seção transversal de captura de elétrons da amostra, que depende do número atômico  $Z$  e a densidade do material (BECKER, 2012).

O MEV (microscópio eletrônico de varredura) é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise das características microestruturais de materiais sólidos (DEDAVID, GOMES E MACHADO, 2007). O funcionamento do MEV utiliza um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica, enquanto isso a varredura é perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente.

Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio aquecido. O feixe é acelerado por alta tensão (entre 1 e 50kV, tipicamente) e focalizado na amostra por um conjunto de lentes eletromagnéticas (num *spot* de alguns nanômetros). O feixe, ao interagir com a amostra, produz elétrons e fótons que podem ser coletadas. Quando o feixe primário incide na amostra, parte dos elétrons difunde-se e interage num volume que depende principalmente da tensão e do número atômico da amostra. Neste volume, elétrons e ondas eletromagnéticas produzidos servem de base para formar as imagens ou, ainda,

para efetuar análises físico-químicas. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra: “Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados” (DEDAVID, GOMES e MACHADO, 2007, pg.11 e 12).

## 2.4 Fungos

Uma vez sintetizadas e as nanopartículas e desenvolvidos os substratos, a sequência deste trabalho implica no emprego dessas nanoestruturas para a detecção de (bio)analitos de interesse via espectroscopia SERS. Durante o desenvolvimento dos substratos, teve início uma colaboração que permitiu acesso a diversas espécies de fungos, o que abriu um campo de trabalho promissor: explorar a espectroscopia SERS para realizar a detecção e a diferenciação de espécies de fungo, com viés na área da saúde. Daí a necessidade de incorporar o assunto na sequência deste capítulo.

Existem cerca de 1,5 milhão de espécies diferentes de fungos na Terra, os quais são responsáveis por, frequentemente, causar doenças e micoses, sendo essas associadas a espécies amplamente distribuídas no ambiente, embora se saiba que menos de 300 espécies causem infecções em humanos e animais (WITKOWSKA, 2016).

As leveduras do gênero *Candida spp* são um importante agente causador de sepsis tardia em pacientes imunocomprometidos e pacientes pediátricos (MURO, 2012).

As infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Cândida* podem atingir mucosas ou se manifestar de forma sistêmica, nas quais o fungo invade e penetra órgãos ou tecidos internos e / ou atinge a corrente sanguínea e se espalha em todo o corpo (candidemia) (CALDERONE, 2002; ANTINORI, 2016). A candidíase invasiva é responsável por aproximadamente três quartos das infecções fúngicas sistêmicas e

pode ser uma condição com risco de vida, especialmente em casos de pacientes imunocomprometidos (ANTINORI, 2016; WILSON *et al.*, 2002; PAPPAS *et al.*, 2018).

Há fungos hialinos (sem cor) e fungos pigmentados. Dentre os hialinos, a espécie *C. glabrata* tem sido relatada como agente etiológico de candidíases invasivas, assim como a *C. albicans*, um dos principais agentes causais de candidemia, principalmente em pacientes imunocomprometidos (MARRA *et al.*, 2011; BODEY *et al.*, 2002). São considerados fatores de alto risco para desenvolver infecção por *C. glabrata*, especialmente pessoas com idade avançada, diagnosticadas com a presença de câncer e/ou diabetes.

Embora a *C. albicans* seja ainda considerada a principal espécie do gênero e uma das mais importantes causadoras de infecções em muitos países, como os EUA, França e Tailândia, foi observado a partir da década de 1990 um aumento na incidência das espécies *Candida* não-*albicans* em diversos centros médicos hospitalares em todo o mundo (MARRA *et al.*, 2011; PFALLER *et al.*, 2011; PARMELAND *et al.*, 2013). Dentre as espécies não-*albicans* mais frequentemente encontradas destacam-se: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (STORTI *et al.*, 2012).

*Candida tropicalis* é um agente frequente de candidemia em hospitais brasileiros e tem ocorrência de infecção em pacientes de todas as idades, com maior frequência em adultos e idosos (MURO, 2012).

Considerada uma das mais comuns infecções sanguíneas nosocomiais, a candidemia aumentou a incidência nas últimas décadas, principalmente devido ao aumento intensivo de quimioterapias e radioterapias (FALAGAS, M., ROUSSOS, N., VARDAKAS, 2010). Além disso, candidemias são de difícil diagnóstico, podendo estar envolvidas em diferentes regiões do corpo como: fígado, peritônio, ossos, entre outros (ANTINORI *et al.*, 2016). Existe, ainda, o grave problema da resistência a antifúngicos, de modo que alguns fungos, como a *C. auris*, constituem sério risco em casos de infecção hospitalar, por exemplo. Então, necessita-se fortemente de métodos de identificação efetivos e rápidos. De fato, a espécie *C. auris* emergiu como uma importante mudança no paradigma de pacientes admitidos em UTIs devido à ocorrência de surtos potenciais pela resistência a multidrogas (RUDRAMURTHY *et al.*, 2017).

O gênero *Fusarium* exibe um alto grau de diversidade em relação a atributos morfológicos, fisiológicos e ecológicos, de tal forma que ocorre em diversos locais geograficamente distintos no mundo, assim como causa uma série de males e doenças (LAZAROTTO, 2013).

Outro gênero de fundamental importância, especialmente no Brasil, são as leveduras negras (fungos pigmentados) pertencentes à família *Herpotrichiellaceae* da ordem *Chaetothyriales*, por serem microrganismos extremamente relevantes do ponto de vista clínico e ecológico, sendo encontradas regularmente como agentes causadores de doenças em animais vertebrados (HOOG *et al.* 2011; VICENTE *et al.* 2017). Em humanos, as infecções variam de superficiais, cutâneo-subcutâneas a neurotropismo fatal, levando a mutilações graves que ocorrem em pacientes com doença imune e/ou portadores de doença metabólica subjacente.

As recorrentes e consistentes infecções causadas por estes agentes indicam uma possibilidade de adaptação ao hospedeiro (NAJAFZADEH, *et al.* 2011). Vicente *et al.* (2012, 2013) descreveram o gênero *Fonsecaea* e foram relatadas diferentes espécies associadas a hospedeiros humanos, animais e de fontes ambientais, cuja ecologia parece direcionar a evolução de quadros clínicos da doença. O oligotrofismo destes agentes (SATOW *et al.*, 2008) os torna hábeis a sobreviver em substratos onde sapróbios comuns estão ausentes. Tais agentes parecem então apresentar um ciclo de vida composto e um potencial de patogenicidade, justificando assim a baixa ocorrência ambiental e a frequência de infecção em hospedeiros animais. Este potencial de infecção parece ser polifilético e conseqüentemente difere entre as espécies (NAJAFZADEH *et al.* 2010/2011; BADALI *et al.*, 2008).

Entre as doenças causadas por estes agentes, a cromoblastomicose é uma doença crônica caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas e subcutâneas de aspecto verrugoso podendo emergir como erupções ulcerativas de aspecto tumoral, caracterizadas pela presença de corpos acastanhados septados denominados de corpos muriformes no interior dos tecidos. Assumida como uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (ONU), recentemente foi classificada como micose de implantação. A cromoblastomicose ocorre principalmente em regiões tropicais ao



redor do mundo e tem sido epidemiologicamente associada à infecção traumática por plantas, cujo principal agente é a espécie *Fonsecaea pedrosoi* em áreas tropicais e a *Cladophialophora carrionii* em climas áridos. Marques *et al.* em 2006, isolaram esta espécie a partir de fonte ambiental, da casca do coco da palmeira Babaçu (*Orbignya phalerata*). Porém, Vicente *et al.* (2013) avaliando as plantas Japicanga (*Smilax species*, *Smilacaceae*) e palmeira Babaçu (*Orbignya speciosa*), epidemiologicamente associadas à cromoblastomicose em regiões brasileiras endêmicas, verificaram que linhagens ambientais eram filogeneticamente relacionadas, porém pertencentes a espécies diferentes daquelas causadoras de cromoblastomicose e foram descritas como espécies novas: *Fonsecaea erecta* e *F. minima*. Sendo assim, os mecanismos relacionados à origem ambiental destes agentes ainda não foram totalmente elucidados.

Embora o Brasil seja considerado uma das regiões endêmicas com altos recordes da doença, a epidemiologia desta ainda não foi totalmente elucidada. A doença representa um problema de saúde pública para a população de determinadas regiões brasileiras e do Continente Americano, e em função deste cenário, organizar os dados de registros epidemiológicos e protocolos de tratamento é uma demanda emergencial (QUEIROZ-TELLES *et al.* 2017). Questões referentes à rota de infecção, agentes (espécies prevalentes) e à relação destes com a variabilidade dos casos clínicos (diferentes tipos e gravidade das lesões) e conseqüentemente variações ao que se refere à resposta ao tratamento e cura da doença, assim como o potencial de virulência dos isolados procedentes de origem humana e ambiental, devem ser esclarecidas.

Para que estudos sobre a epidemiologia possam avançar, é fundamental ter à disposição um método eficiente para detectar o agente etiológico. Idealmente, este método deve ser capaz de detectar a presença destes agentes em amostras teciduais de em indivíduos doentes e ser utilizado em amostras ambientais como solo, folhas e sedimento. Métodos moleculares baseados em marcadores (iniciadores) específicos têm sido utilizados com sucesso em vários contextos ecológicos para a detecção de DNA de organismos-alvo (PIE *et al.*, 2006; WHITE, 1990; HOOG *et al.*, 2004). Estes

são altamente específicos, mas sua sensibilidade tem sido limitada e, além disso, podem envolver equipamentos e técnicas que demandam maior tempo para processamento e apresentam alto custo.

Assim, torna-se fundamental o desenvolvimento de técnicas alternativas aos métodos tradicionais de identificação, caracterização e diagnóstico desses fungos. Isso, tendo como plano de fundo a distinção entre estrutura externa e interna dos fungos hialinos (como as *cândidas*) e os fungos negros (como as *Fonsecaeas*). Neste contexto, o uso de espectroscopia vibracional, particularmente Raman e SERS, desponta como oportunidade interessante, principalmente porque estes sensores podem ser de baixo custo, produzir resultados rápidos e ser também compatíveis com o conceito *point-of-care*, no caso de aplicações voltadas à área da saúde.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados na produção e caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de níquel, cobalto e bismuto, assim como seus respectivos substratos. Também contempla como são cultivados, separados, escolhidos e preparados os fungos para caracterização e análise via espectroscopia SERS.

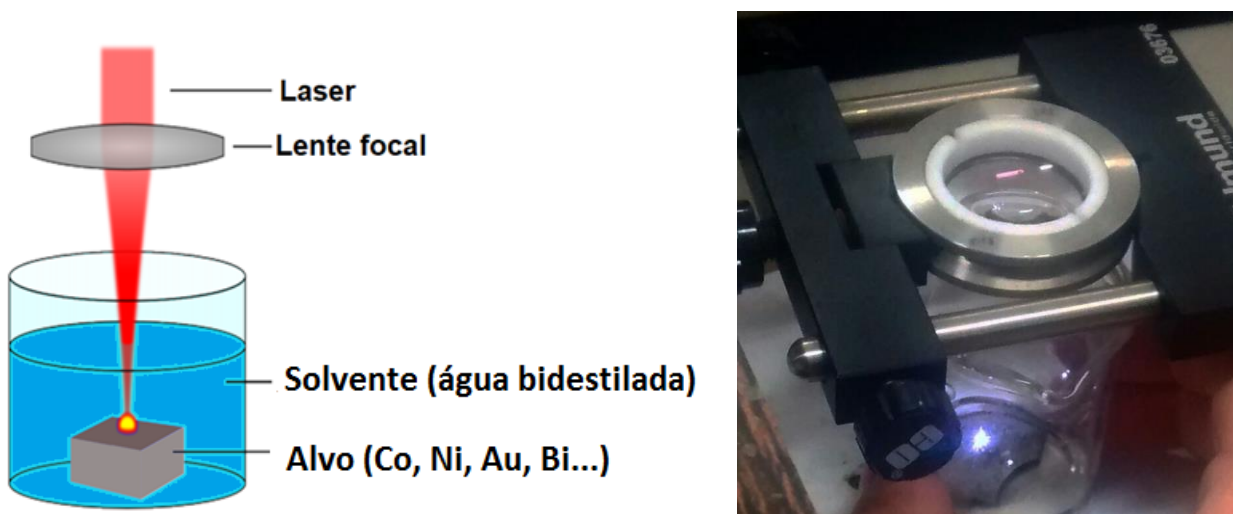
#### 3.1 A síntese de nanopartículas por ablação a laser

As nanopartículas foram sintetizadas pela técnica de ablação a laser em solução (LAL), cuja descrição e operação são descritas na seção 2.1. O laser utilizado foi um Nd:YAG Quantronix, modelo 177 operando em 1064 nm, em regime *Q-switched*, à taxa de 1,5 kHz, com pulsos de 200 ns, 3 mJ e fluência  $2,4 \times 10^6$  J/m<sup>2</sup> (porque focalizado com uma lente de distância focal igual a 5 cm).

Como o objetivo era utilizar as nanopartículas para sensoriamento diagnóstico, não seria conveniente haver resíduos de solventes orgânicos no coloide. Por isso, a água foi a melhor opção de meio para LAL. Foram colocados 5 ml de água bidestilada em cada um dos béqueres (10 ml) que já continham, respectivamente, os alvos de níquel, cobalto e bismuto no fundo. As ablações foram realizadas por períodos de 5 minutos. O mesmo foi feito para os alvos de ouro, porque essas nanopartículas também foram usadas em alguns experimentos, a fim de possibilitar comparações entre Ni, Co, Bi e Au.

A Figura 11 ilustra a configuração experimental do processo.

Figura 11 - Ilustração da configuração experimental para a ablação a laser (esquerda) e uma foto do processo tal como se dá no laboratório (direita).



Fonte: A autora (2020)

As taxas de ablação para Ni, Co, Bi e Au são, respectivamente: 0,2 mg/min, 0,2 mg/ml, 2,0 mg/ml e 1,0 mg/ml, segundo parâmetros determinados em trabalhos anteriores no grupo Fotonanobio.

### 3.2 UV-Vis, DLS, AFM e Perfilometria

A absorvância das nanopartículas foi medida por meio da espectroscopia UV-Vis. Um espectrômetro *Ocean Optics Model USB 2000+*, com faixa de operação entre 200 nm e 1000 nm e resolução de 0,1 nm foi utilizado para realização das medidas. Para explorar ao máximo a resolução e a capacidade de operação do equipamento foi tomado como volume máximo para as medidas 2 ml. Outro aspecto levado em consideração foi o cuidado de durante a obtenção dos dados de calibração verificar se a extinção ficou abaixo de 1 OD, isso porque valores acima desse causam um efeito de filtro interno (alta absorção). Na Figura 12 é apresentada uma fotografia do espectrômetro e uma visão geral dos coloides.

Figura 12 - À esquerda, (plano principal) o espectrômetro UV-Vis. À direita, as cubetas utilizadas para o experimento, assim como os eppendorffs (ao fundo) com nanopartículas e os béqueres com nanopartículas (Bi) e água respectivamente.

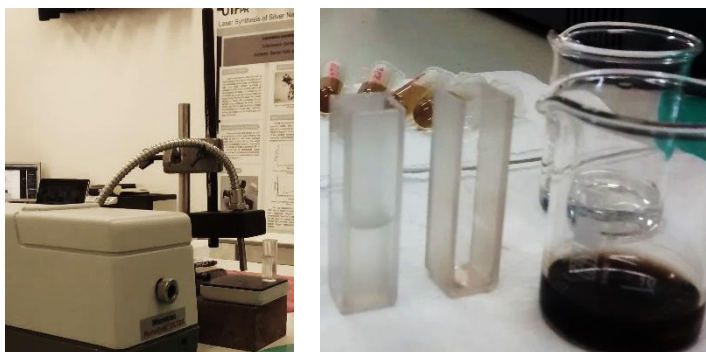


Fonte: A autora (2020)

Para calibrar o equipamento foi utilizada água bidestilada e para diluir o coloide de nanopartículas também. Após alguns testes empíricos, foi determinado que o volume de 1 ml de nanopartícula para 1 ml de água mantinha a absorção abaixo de 1 OD e permitia a aquisição de espectros reprodutíveis no UV-Vis.

Para obtenção do tamanho médio das nanopartículas e os dados de sua dispersão foi utilizado o DLS. O equipamento que permitiu essas medições foi um *Microtrac Nanotrak Ultra*, cuja operação foi realizada em 2 ml do coloide de nanopartículas. Aqui, diferentemente do UV-Vis, não foi necessário fazer a diluição do coloide. Para efeito de curiosidade, a aquisição foi realizada com e sem a diluição, mas a resposta foi muito similar (menos de 1% de diferença) de tal forma que a diluição foi descartada para análises nesse equipamento. Na Figura 13 são apresentadas fotografias do equipamento DLS e de alguns coloides usados nas medidas.

Figura 13 - À esquerda, o DLS e, à direita, as cubetas utilizadas para o experimento, assim como o béquer com nanopartículas (Bi)



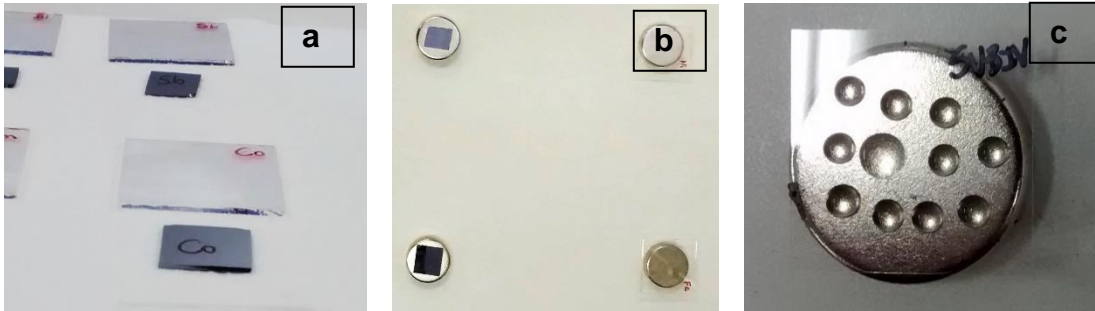
Fonte: A autora (2020)

Tanto para o UV-Vis, quanto para o DLS, as nanopartículas estavam em solução. Para a produção dos substratos, os coloides foram depositados em substratos de silício e de vidro e deixados para evaporar. Depois de seca a água, formaram-se filmes de nanopartículas – esses filmes constituem os substratos SERS propriamente ditos. Então, foi necessária a utilização de outro equipamento, a fim de verificar não apenas a homogeneidade da deposição, mas também para comparar os dados de tamanhos das nanopartículas depositadas na superfície com aqueles obtidos por meio de DLS. Para isso foi utilizado um AFM modelo *Shimadzu SPM 9500 J3*, com resolução de 0,3 nm. Para execução da análise foi depositada uma gota de 2  $\mu\text{l}$  de cada coloide com nanopartículas em lâminas de silício e de vidro e as gotas ficaram secando em temperatura ambiente dentro de uma estufa por 24 h.

A fim de obter maior homogeneidade na distribuição de nanopartículas, também foram produzidos substratos de uma forma diferente do tradicional *drop casting* (que consiste em depositar gotas e aguardar a secagem): antes de pingar as gotas, os substratos, tanto de silício quanto de vidro, foram dispostos sobre imãs de cádmio-neodímio, com campo entre 263 mT e 272 mT, a fim de garantir que quando a gotas fossem depositadas e postas para secar o campo magnético dos imãs seria capaz de ajustá-las em uma configuração mais uniforme do que já havia até então (sem a presença do campo magnético). Isso funciona de modo mais eficiente com as

nanopartículas de cobalto e níquel, pois estas são ferromagnéticas. Na Figura 14 observa-se um detalhe de como foram realizados os depósitos das gotas de coloides para a produção dos substratos.

Figura 14 - Produção dos substratos: (a) Lâminas de silício e vidro (esquerda). (b) Lâminas de vidro sobre os ímãs (centro). (c) Diversas gotas de um coloide depositadas para secar na lâmina de vidro sob ação do campo magnético do ímã.



Fonte: A autora (2020)

Note-se que foram produzidos filmes (substratos) depositando gotas de coloides (Ni, Co, Bi) em lâminas de vidro e de silício. Em geral, foram depositadas entre 9 e 12 gotas de 1 ou 2  $\mu\text{l}$ . As lâminas com as gotas foram secas em dois regimes distintos: com e sem a influência do campo magnético do ímã. Assim, foi possível comparar a distribuição das nanopartículas nas lâminas “sem” e “com” a presença do campo magnético. A hipótese inicial era que, sob o efeito do campo magnético, seriam produzidos substratos mais uniformes e, por conseguinte, com maior potencial de serem empregados em experimentos SERS.

Com intuito de comparar a estrutura e homogeneidade dos substratos com as nanopartículas ferromagnéticas, foi utilizado o perfilômetro modelo Talysurf CCI, com resolução de 0,01nm para o eixo z. As amostras foram feitas no mesmo dia que aquelas analisadas por AFM para que fosse possível melhor comparar os resultados das duas técnicas diferentes.

### 3.3 MEV e EDS

Com intuito de fazer uma caracterização completa tanto das nanopartículas, a fim de compará-las entre si, quanto para obter um panorama completo referente à homogeneidade e eficiência de cada filme, mais dois microscópios foram utilizados para verificar a morfologia, distribuição e composição dos filmes. Para essas medidas foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo TESCAN VEGA3 LMU, com resolução de 3 nm e ampliação máxima de 100.000 vezes.

O preparo das amostras para o MEV foi exatamente o mesmo do AFM, exceto que o MEV exigiria um processo a mais, chamado de metalização, que consiste em depositar uma fina camada de ouro sobre a amostra para garantir um apropriado funcionamento do microscópio. Entretanto, não houve necessidade dessa etapa, pois como as nanopartículas já eram constituídas de metal, isso garantiu a eficiência das medidas e, mais que isso, garantiu dados mais precisos em relação aos metais que constituíam os filmes.

O mesmo equipamento (MEV) possui um módulo que permitiu realizar as medidas da Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS - *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*). Isso é importante porque essa técnica permite determinar com precisão quais são os materiais que constituem a amostra, além de fornecer dados quantitativos sobre as proporções de cada elemento. Isso acontece porque a amostra é bombardeada por um feixe de elétrons com capacidade de ionização atômica. Quando os elétrons decaem para os níveis de energia menores, emitem raios x que são detectados. Uma vez que cada elemento possui uma energia definida de transição, é possível detectar os átomos presentes no material (NADAS, 2019).

### 3.4 TEM

A Microscopia Eletrônica de Transmissão também foi uma das técnicas utilizadas para caracterizar nanopartículas e filmes (substratos), neste caso especialmente para confirmar morfologia, tamanhos relativos e valores médios dos colóides em questão,



pois, devido à configuração do equipamento para análise, não era possível realizar a caracterização do filme feito sobre os ímãs. Um microscópio JEOL JEM1200EX-II operando a uma tensão de 120kV foi utilizado para essas medidas.

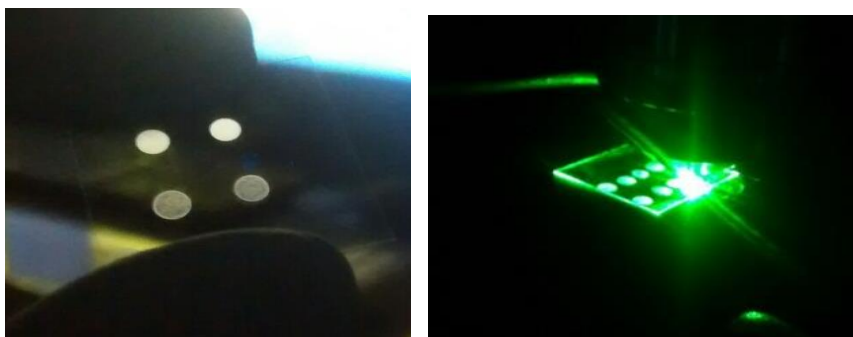
As amostras foram preparadas alguns minutos antes das medidas. O preparo consistiu basicamente em pingar alguns microlitros (tipicamente 4  $\mu$ l), do coloide sobre uma grade especial de cobre. Essa grade é especial pelo seu tamanho, disposição espacial de linhas e composição. O tempo para secagem foi de aproximadamente 30 minutos e logo em seguida as grades foram inseridas no equipamento para análise.

Uma vez que as imagens foram obtidas, a funcionalidade do equipamento permitiu que também fosse feita também a Difração de Elétrons em Área Seleccionada (SAED - *Selected Area Electron Diffraction*). Esse é um dado importante, porque auxilia na determinação do tipo de estrutura cristalina que as nanopartículas possuem, através do cálculo das distâncias interplanares e comparação de dados cristalográficos (UNIVERSITY OF CAMBRIDGE, 2007).

### 3.5 Substratos SERS

Feita a caracterização das nanopartículas em relação a tamanho, distribuição e estrutura, foi possível realizar a produção dos filmes para detecção de biomoléculas utilizando a espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS). Na Figura 15, pode-se ver um substrato típico contendo quatro regiões com nanopartículas (e analitos depositados), bem como um detalhe de uso do substrato no microscópio Raman.

Figura 15 - Esquerda - filmes de nanopartículas de Co em lâmina de vidro (esquerda): note-se que há quatro regiões com nanopartículas depositadas; cada região pode ser utilizada para um experimento SERS distinto. Direita – após secagem do analito depositado, o substrato é iluminado com o laser para o experimento no espectrômetro Raman.



Fonte: A autora (2020)

Os filmes foram fabricados com a deposição de  $2\mu\text{l}$  do coloide de nanopartículas de Ni, Co, Bi e Au, respectivamente, em uma lâmina de vidro sob um campo magnético  $H = 263\text{ mT}$ ; as lâminas ficaram em uma pequena estufa para secagem durante 24h (THALER *et al.*, 2018). Como mencionado, a proposta de utilizar os ímãs foi produzir filmes mais homogêneos e finos que possibilitassem assim uma maior concentração e distribuição de *hot spots*.

### 3.6 Espectroscopia Raman/SERS

Para aquisição dos dados de espectroscopia Raman, a fim de comprovar o efeito SERS com as nanopartículas e substratos produzidos, foi utilizado o microscópio que aparece na Figura 16.

Figura 16 - Imagem da configuração experimental do microscópio Raman. Gotas (tipicamente 2 a 4  $\mu\text{l}$ ) contendo nanopartículas e analitos são depositadas em uma lâmina de microscópio e, após secas, vão para análise. A lâmina é colocada em uma base móvel e o laser é focalizado de cima para baixo; a luz espalhada é coletada pela mesma lente e processada pelo equipamento.



Fonte: A autora (2020)

O microscópio utilizado foi um Microscópio Raman Confocal Witec alpha 300R com resolução lateral de 200 nm e resolução vertical de 500 nm, operando em 532 nm (verde) com potência entre 3 mW e 10 mW. Foram utilizados diferentes tempos de aquisição e números de acumulação de espectros para as diferentes moléculas analisadas.

Em um dos procedimentos, chamado de “gota-gota” (BEZERRA Jr. *et al*, 2017), foi colocado 2 $\mu\text{l}$  do coloide com nanopartículas e 2 $\mu\text{l}$  das moléculas de aminoácidos, um sobre o outro (“gota-gota”), em uma lâmina de vidro e, após alguns minutos, já secos, os espectros foram medidos com o microscópio. Em outro procedimento, foram usados os substratos: 2 $\mu\text{l}$  das amostras dos analitos foram pingados sobre o substrato e deixadas secar.

Esses métodos foram realizados para todas as amostras, tendo pequenas variações nas aquisições de dados para cada tipo de analito. Isso porque o tamanho das moléculas e composição influenciou diretamente na capacidade de detecção do sensor, sendo necessários alguns ajustes personalizados para cada amostra. Os dados

específicos de cada medida e suas respectivas alterações serão esclarecidos e justificados na próxima seção.

Para avaliação da eficiência dos substratos foram tomadas como amostras (analitos) aminoácidos, que são partes fundamentais da constituição e organização estrutural dos organismos vivos. Uma vez que o objetivo do produto final era utilizar SERS em sensores para aplicações biológicas e nas áreas da saúde, começar pela identificação, diferenciação e caracterização desses aminoácidos constitui um passo inicial fundamental.

Um dos aminoácidos de escolha foi a prolina (PRO),  $C_5H_9NO_2$ , 99% (Sigma Aldrich). A prolina é um amino ácido proteogênico utilizado na biossíntese de proteínas. Uma solução aquosa desse aminoácido foi feita com uma concentração de 5mM, em água Mili-Q bidestilada. Note-se que esta concentração de analito (5mM) não contém material suficiente para a obtenção de um espectro Raman bem definido, portanto, qualquer espectro obtido na presença das nanopartículas e substratos implica na existência de aumento plasmônico (SERS). Uma gota dessa solução foi depositada em cima do substrato e, após a secagem, foi obtido o espectro Raman. Nesse caso, optamos por analisar os espectros obtidos após a amostra seca, mas nada impede que o mesmo seja realizado com as amostras ainda em solução, o que se chama configuração dinâmica de SERS (D-SERS). Para efeito de comparação, um espectro da substância pura (em pó) em uma alta concentração foi obtido a fim de ser utilizado como parâmetro de comparação com as amostras diluídas 100x associadas ao substrato.

Além da prolina foi utilizado como analito o aminoácido glicina. Outro material de importância biológica, a ureia, também foi empregado. Além dessas moléculas simples, houve uma extensão dos experimentos para microrganismos, mais especificamente, alguns fungos, tendo em vista a demanda que surgiu para o grupo de pesquisa no decorrer do desenvolvimento desse projeto.

### 3.7 Fungos

Cada espécie de fungo possui características distintas de cultivo e crescimento, assim como armazenamento e tempo de vida útil para pesquisa.

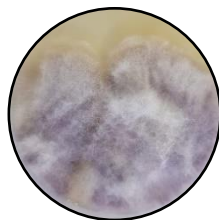
Os fungos hialinos selecionados para a realização do trabalho foram as *Candidas albicans*, *glabrata*, *kefyr*, *tropicalis*, *guilliermondii* e o *Fusarium sp*, enquanto os negros foram *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea pugnacius* e *Fonsecaea monophora*. Esses fungos foram cultivados em meio líquido, meio sólido e inoculados no modelo de organismo tenébrio.

Foi utilizado o meio de cultura sólido, sendo que cada espécie ficou inoculada em estufa com temperatura controlada por 15 dias. Por terem estruturas externas e internas distintas, um dos parâmetros para manter a ordem e padronização das medidas, foi o tempo que os fungos ficaram inoculados. Independente da espécie eles ficaram o mesmo tempo, na mesma temperatura e sob as mesmas condições. As dissenções de volume e quantidade de micro-organismos foram sanadas com o cálculo de concentração pela câmara de *Neubauer*. Com isso, as variáveis foram reduzidas para garantir sinais mais precisos com amostras bem definidas. Na Figura 17 são apresentadas algumas imagens de placas contendo fungos usados no trabalho.

Figura 17 - Imagem dos fungos cultivados usados como base para as primeiras detecções via SERS.



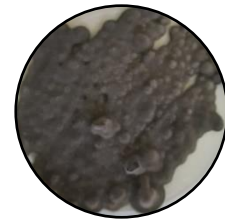
*Candida albicans*



*Fusarium sp.*



*Fonsecaea pugnacius*



*Fonsecaea pedrosoi*

Os fungos em meio sólido, como já mencionado, foram cultivados em estufas. Uma pequena quantidade era retirada do meio com o auxílio de um palito de dente autoclavado. Esta amostra era então colocada em um *ependorff*, logo em seguida era adicionado cerca de 1mL de água milli-Q e misturada no vórtex. A câmara de *Neubauer* foi então utilizada para fazer a estimativa da concentração das amostras preparadas. As amostras do meio líquido eram cultivadas no *shaker* e preparadas da mesma maneira, exceto no início, pois era filtrada utilizando água milli-Q e filtros de papel autoclavados para garantir que não haveria resíduos do meio de cultura, com isso então, eram colocadas no *ependorff*.

Para a preparação das amostras de tenébrios inoculados (Figura 18), os indivíduos inoculados foram mantidos no escuro durante 7 dias a 37°C.

Figura 18 - Tenébrios inoculados com os fungos negros.



Fonte: A autora (2019)

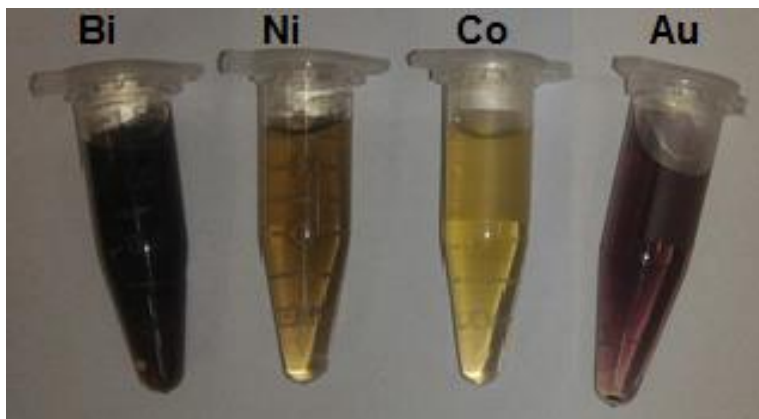
A hemocele dos tenébrios era então removida e colocada em um *ependorf* com 1 mL de água milli-Q e, em seguida, levada ao vórtex até ser formada uma solução homogênea. Os tenébrios são seres simples, com uma estrutura interna e externa também ordinária em comparação com outros tipos de seres vivos que poderiam ter sido submetidos aos testes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 As nanopartículas sintetizadas

A produção de nanopartículas via ablação a laser, conforme descrito no capítulo dois, está associada a uma série de parâmetros e procedimentos metodológicos que vão determinar o tipo de coloide obtido. Com o laser utilizado, temos um padrão característico para cada material, sendo que a cor dos coloides tem relação direta com a concentração, formato e tamanho das nanopartículas. A Figura 19, mostra uma imagem das cores típicas das nanopartículas utilizadas para as análises e experimentos desse trabalho. Optou-se por não adicionar nenhum tipo de estabilizante ou surfactante aos coloides, ainda assim, de forma geral, as nanopartículas de Co e Ni são estáveis por várias semanas ou mesmo alguns meses, enquanto que as de Bi tendem a formar agregados após alguns dias.

Figura 19 - Fotografia de *Eppendorff* contendo coloide de nanopartículas de Bi, Ni, Co e Au. A coloração da suspensão depende da concentração, tamanho e formato das nanopartículas.



Fonte: A autora (2020)

De fato, estes metais, em escala nanométrica apresentam propriedades físicas (por exemplo, a cor) diferentes daquelas quando em estado macroscópico (de “bulk”). A mecânica quântica e a teoria eletromagnética podem ser utilizadas para explicar esse comportamento, porém, não faz parte do escopo desta dissertação realizar esta análise.

Do ponto de vista experimental, buscou-se verificar da maneira mais simples possível se a propriedade ferromagnética do “bulk” estaria presente, ou seja, se as nanopartículas eram atraídas ou não pelo campo magnético de um ímã. Para isso o coloide foi submetido ao campo de um ímã de cádmio neodímio (o mesmo utilizado para posteriormente produzir os substratos), com módulo de campo de 273 mT. Nota-se que, em poucos minutos após a aproximação do ímã, ocorre uma concentração das nanopartículas, portanto, estas são atraídas pelo campo magnético. Uma ilustração desta propriedade é apresentada na Figura 20. Note-se que, após retirado o ímã, é as nanopartículas podem ser ressuspensas por simples agitação do frasco.

Figura 20 - demonstração do caráter ferromagnético das nanopartículas de Co, que são atraídas pelo ímã.



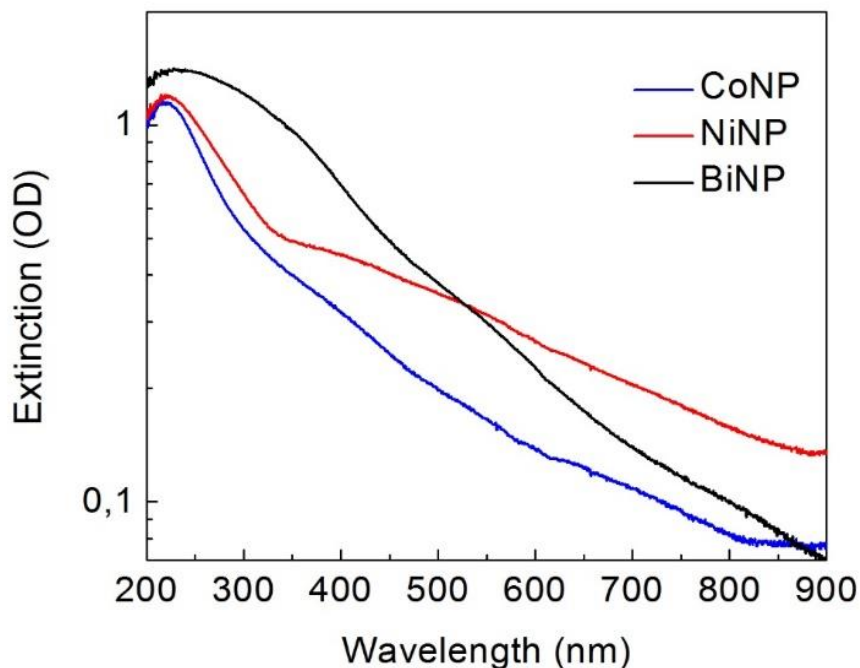
Fonte: A autora (2020)

## 4.2 UV-Vis, DLS

Na Figura 21 são apresentados os espectros típicos das nanopartículas de Ni, Co e Bi sintetizadas por ablação a laser em solução aquosa.



Figura 21 - Extinção para os coloides de Co, Ni e Bi, respectivamente.



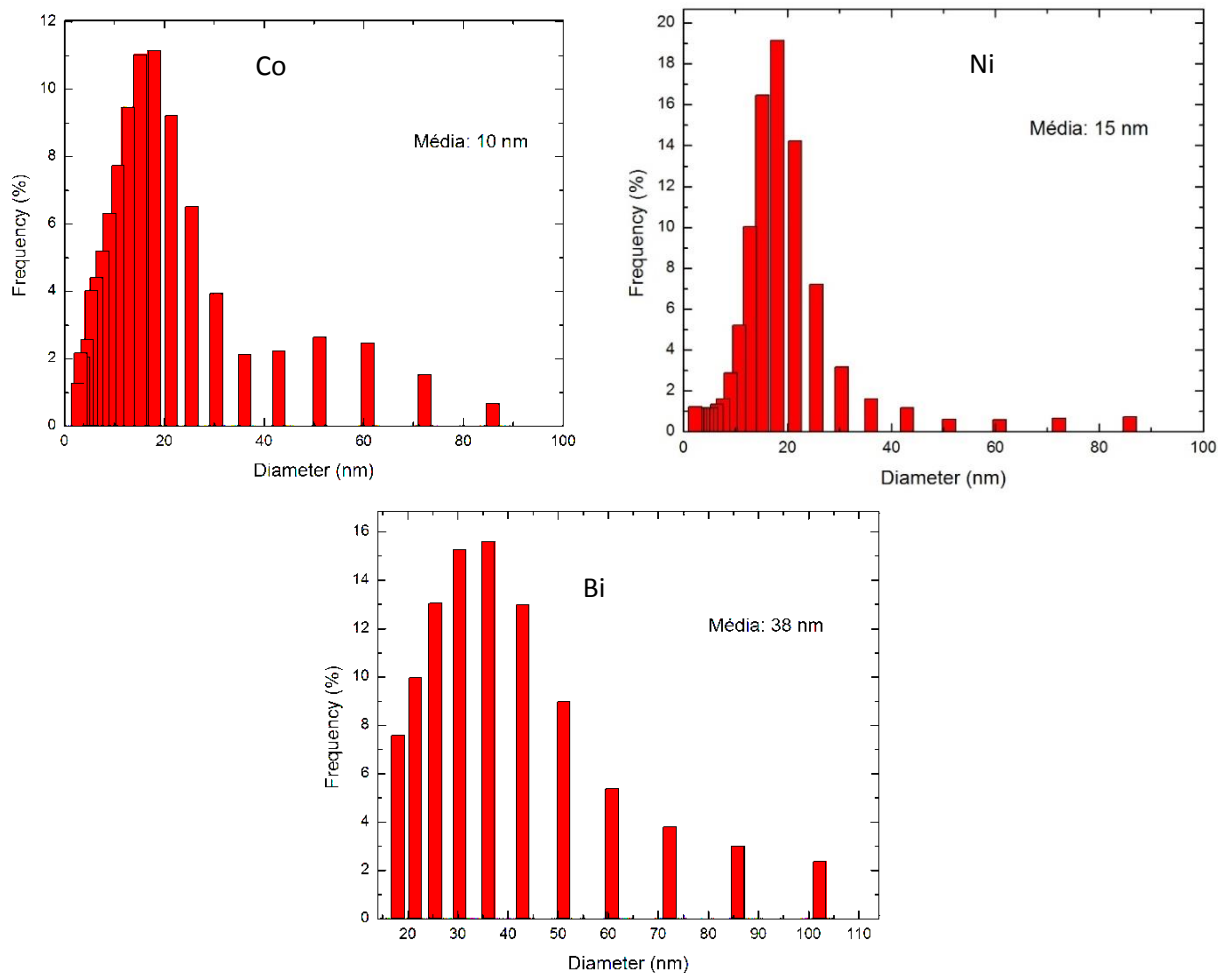
Fonte: A autora (2020)

Na Figura 21, ficam evidentes as múltiplas bandas de plámons (SPR) que são características das nanopartículas metálicas e que estão em acordo com as previsões teóricas (MCMAHON, 2013) e trabalhos experimentais (BEZERRA JR. *et al.*, 2018). De fato, todas essas nanopartículas apresentam picos na região do ultravioleta, em torno de 250 nm; além disso, notam-se bandas menos evidentes na região próxima a 400 nm (Co), entre 400 nm e 600 nm (Ni), e próximo a 350 nm (Bi). Estes dados confirmam a manifestação de propriedades plasmônicas para todas as nanopartículas sintetizadas.

A distribuição de tamanho dessas nanopartículas, segundo dados do DLS, está disposta na Figura 22, evidenciando que o valor médio está centrado em 10 nm para o Co, 15 nm para o Ni e 38 nm para o Bi, sendo que os tamanhos desses coloides estão dispersos entre o valor médio até uma faixa próxima a 100 nm. Essa é uma característica comum do método de ablação a laser, para o qual constitui grande

desafio fazer o controle de tamanhos das nanopartículas produzidas (AMENDOLA e MENEGHETTI, 2013).

Figura 22 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em suspensão, medido por DLS, com diâmetro médio centrado em 10 nm, 15 nm e 38 nm, respectivamente para Co, Ni e Bi.



Fonte: A autora (2020)

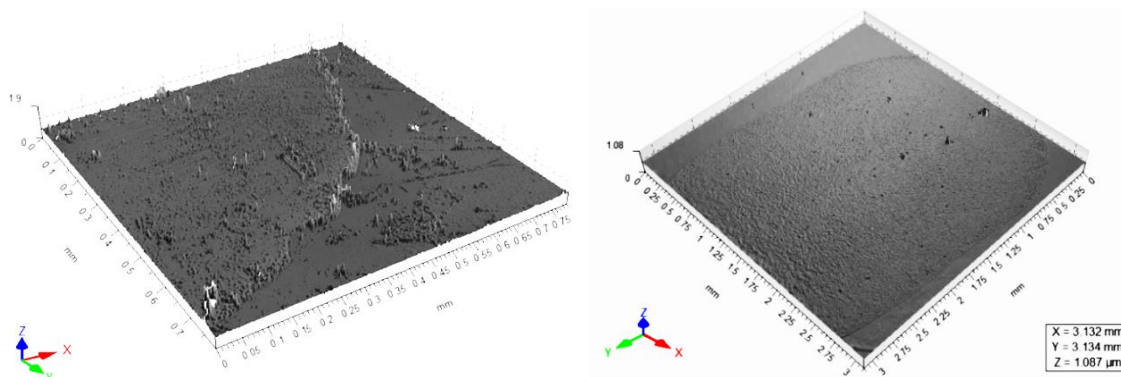
Comparando as taxas de ablação, é possível concluir que o material que tem uma taxa de ablação maior (Bi) tem também a uma faixa de distribuição de tamanhos maior, enquanto o Co e o Ni, que possuem a mesma taxa de ablação, têm uma diferença de tamanhos de partícula menor entre si. Como os parâmetros do laser e o tempo de ablação foram os mesmos para todos os metais, é importante verificar que o

que foi mencionado na seção 1 sobre a influência dos parâmetros do laser para execução do procedimento foi determinante para essas diferenças experimentais.

#### 4.3. AFM e Perfilômetro

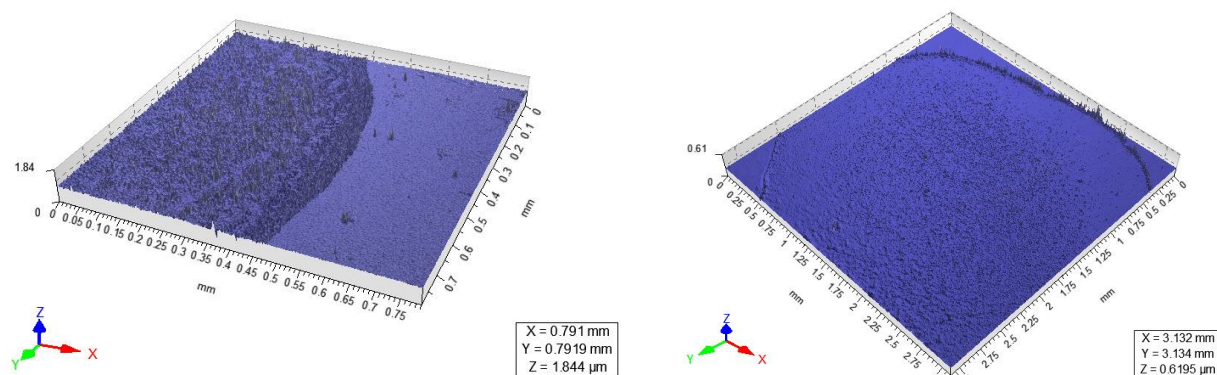
O perfilômetro possibilitou não apenas comparar os filmes com e sem ímã, mas também deu parâmetros acerca da rugosidade média quadrática de cada amostra. Esse resultado é fundamental para avaliar o efeito SERS associado e a aplicabilidade desses filmes para detecção de bioanalitos, bem como o potencial dos substratos para (bio)testes baseados em SERS. A hipótese inicial era que, na presença de campo magnético, as gotas depositadas nas lâminas apresentariam distribuição mais homogênea dos filmes formados pelas nanopartículas. A homogeneidade desses filmes, de fato, foi confirmada conforme indicam as Figuras 23, 24 e 25.

Figura 23 - Dados obtidos do perfilômetro: o lado esquerdo mostra o substrato de NiNP em que as gotas com nanopartículas secaram sem o ímã, enquanto que as da direita se referem aos substratos secos com as lâminas sobre o ímã



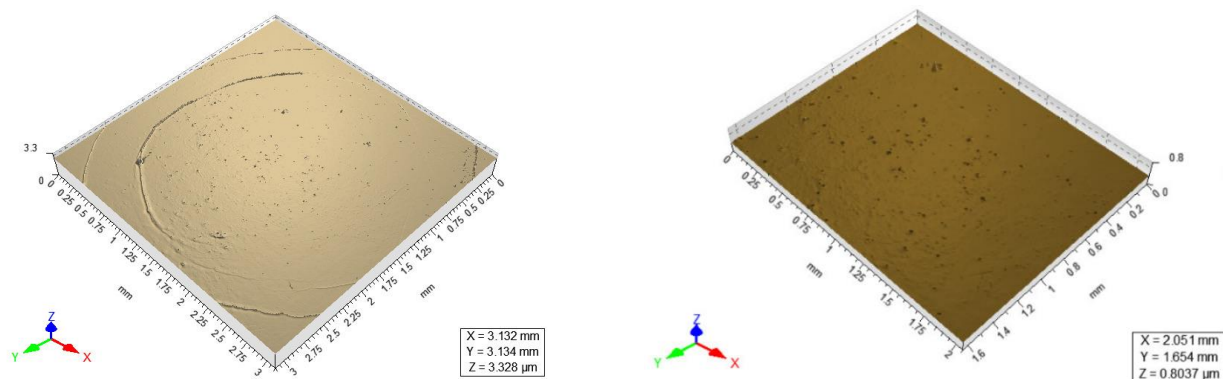
Fonte: A autora (2018)

Figura 24 - Dados obtidos do perfilômetro: o lado esquerdo mostra o substrato de CoNP em que as gotas com nanopartículas secaram sem o imã e as da direita já secos com as lâminas sobre o imã.



Fonte: A autora (2018)

Figura 25 - Dados obtidos do perfilômetro: o lado esquerdo mostra o substrato de BiNP em que as gotas com nanopartículas secaram sem o imã, enquanto que as da direita se referem aos substratos secos com as lâminas sobre o imã.



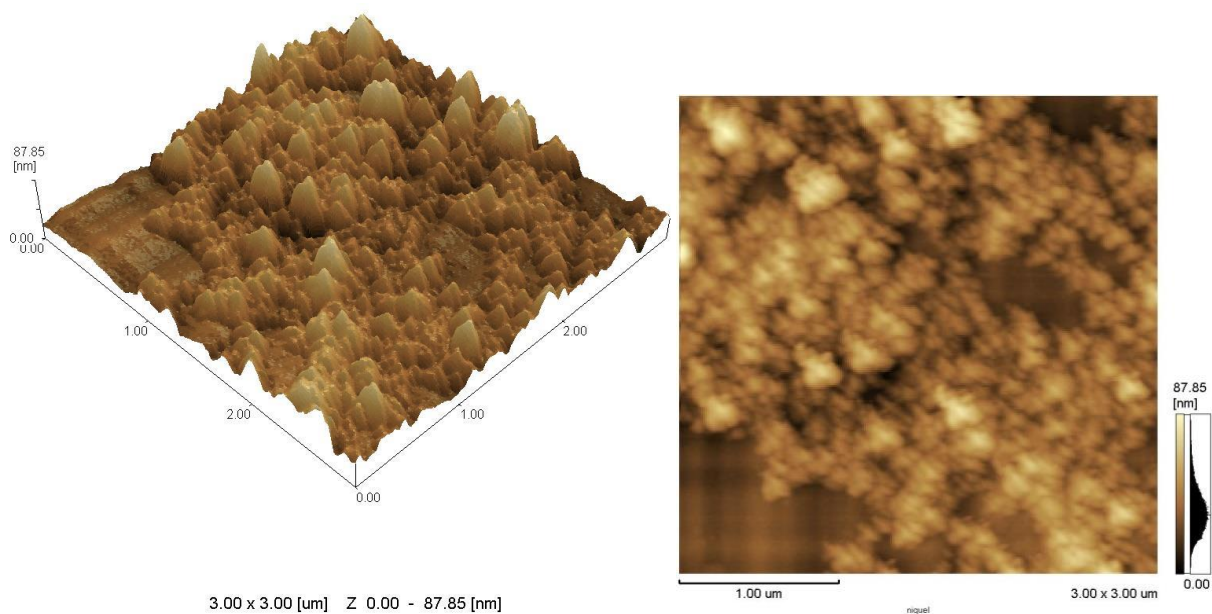
Fonte: A autora (2018)

Das imagens, fica evidente que os filmes secos na presença do campo magnético são mais homogêneos. De acordo com a Figura 23, o Ni apresenta a maior mudança, em termos da homogeneidade obtida, em relação aos demais. É possível constatar ao observar as imagens que os filmes obtidos com assistência do campo magnético não ficaram apenas mais homogêneos, mas ficaram também finos, de tal forma que estão muito próximos do perfil de rugosidade do próprio vidro. Isso é condição importante para criar um substrato SERS eficiente e com potencial para

aplicação na em (bio)testes, tendo em vista que deve haver uma distribuição também mais uniforme de *hot spots*.

Para complementar as informações obtidas com o perfilômetro, as mesmas amostras foram encaminhadas para verificação do padrão de rugosidade em um AFM para que os parâmetros pudessem ser comparados, conforme indicam as Figuras 26, 27 e 28. No caso do AFM, foram analisados somente os substratos produzidos na presença de campo magnético.

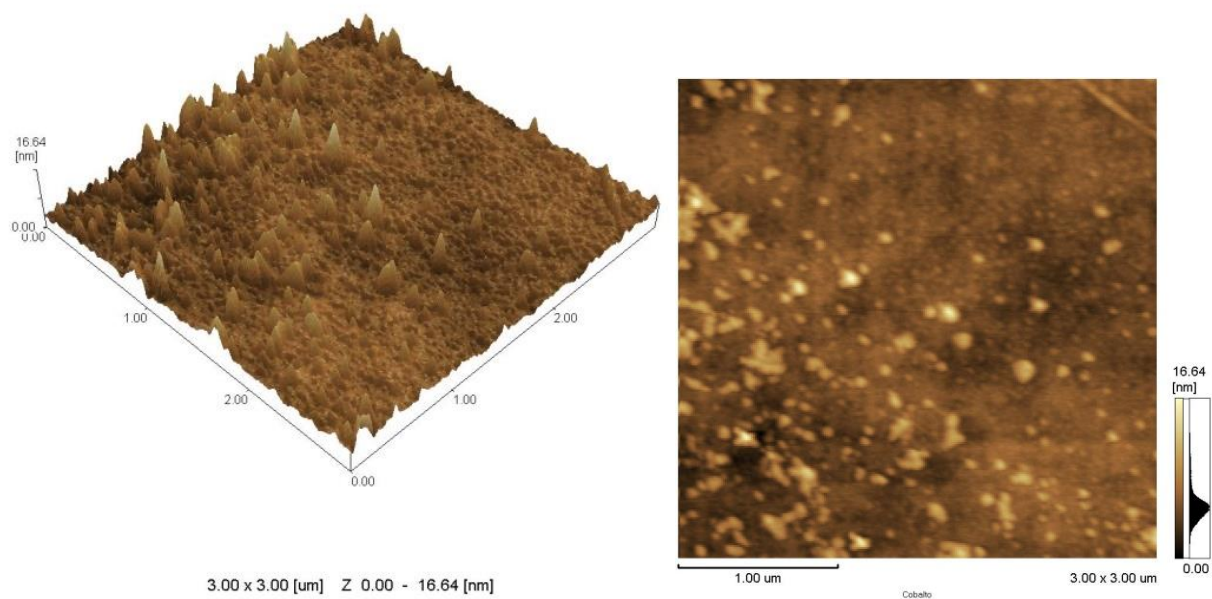
Figura 26 - Dados de rugosidade obtidos com o AFM para a amostra de NiNP.



Fonte: A autora (2018)

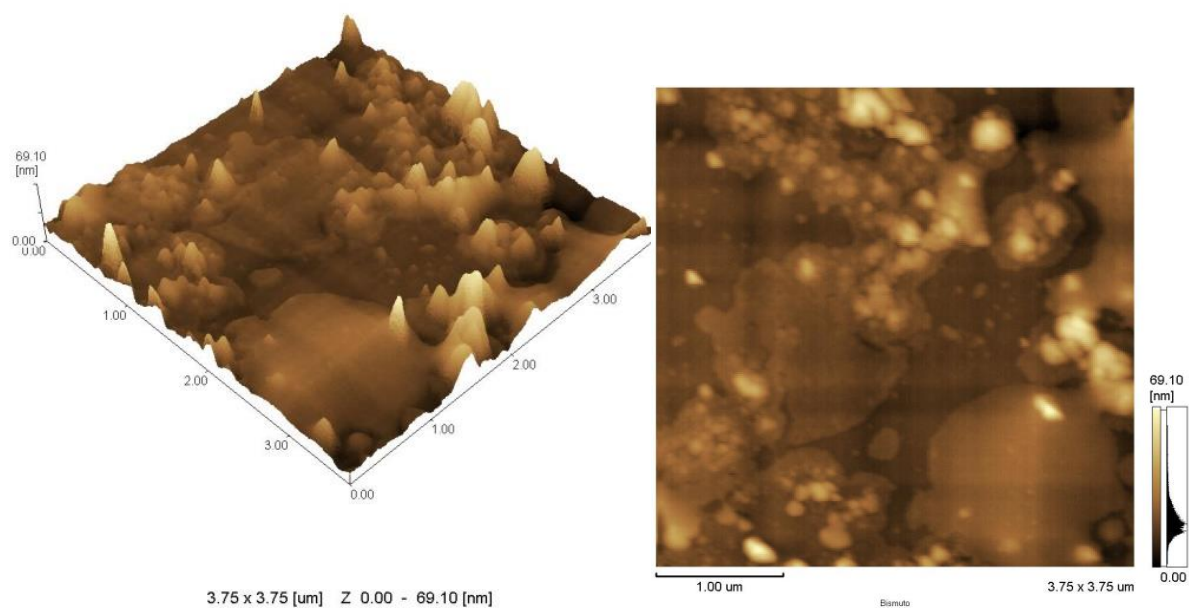


Figura 27 - Dados de rugosidade obtidos com o AFM para a amostra de CoNP.



Fonte: A autora (2018).

Figura 28 - Dados de rugosidade obtidos com o AFM para a amostra de BiNP.



Fonte: A autora (2018)

Nas Figuras, nota-se que as imagens de AFM são compatíveis com os resultados observados nas medidas de perfilometria. Estas imagens permitem visualizar regiões em escala nanométrica que podem ser interpretadas como possíveis *hot spots*.

Para comparar os valores das rugosidades desses filmes, foram analisados os resultados do padrão de rugosidade média quadrática ( $R_{ms}$ ). Os dados da perfilometria mostraram uma redução de 24 % da rugosidade (de 31,5 para 23,9) nas nanopartículas de Ni e 48% nas nanopartículas de Co (de 17,9 para 9,3).

A rugosidade média quadrática é definida como:

$$R_{ms} = \sqrt{\frac{1}{l_m} \int_0^1 |y(x)|^2 dx} \quad (7)$$

Sendo  $l_m$  o comprimento de medição e  $y(x)$  os desvios do perfil de rugosidade.

Com o AFM foram obtidos números de rugosidade compatíveis com a perfilometria, sendo 16 para o cobalto e 17 para o níquel. Isso, considerando que os métodos de análise de rugosidade sejam levemente distintos para ambos os equipamentos. Enquanto o perfilômetro gera primeiro um ponto médio para então criar a base dos cálculos, o AFM toma como média a relação entre o ponto mais alto e o mais baixo medido. Assim, como o AFM possui uma resolução melhor que a do perfilômetro no eixo z (de acordo com os manuais, algo em torno de 10 vezes), é esperado que a rugosidade nesse equipamento fosse um pouco superior, tendo em vista que ele inclui nos cálculos as nanopartículas menores, o que contribui, na média, para um valor um pouco maior, pois quanto mais distinções de tamanhos entre as nanopartículas do substrato, mais termos para o somatório da média.

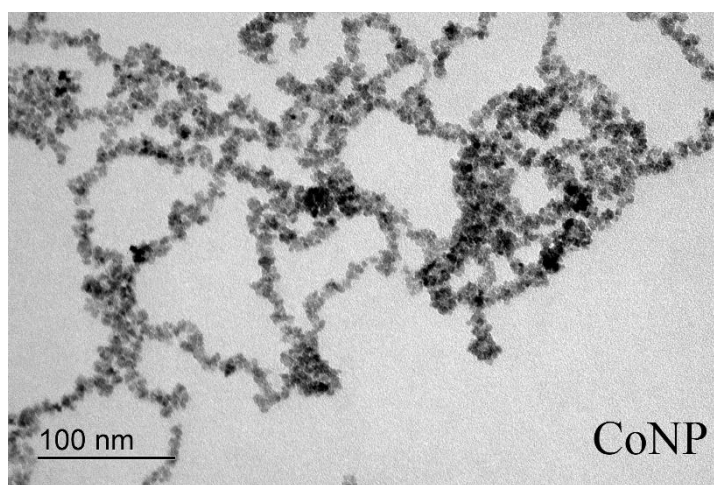
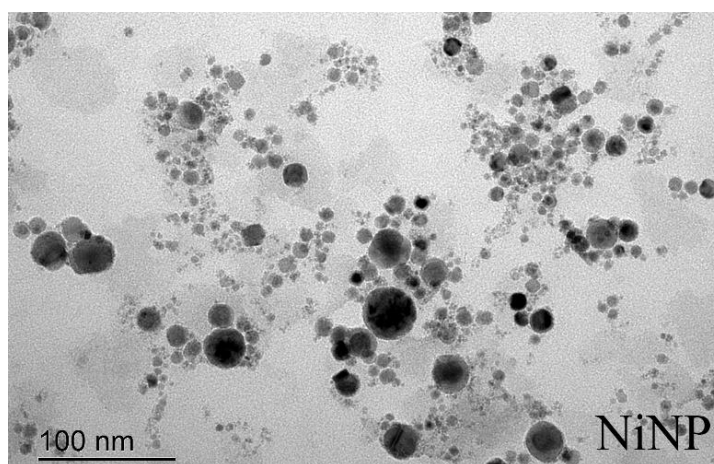
Apesar da diferença em relação à rugosidade nos distintos equipamentos, quando equiparados, ambos comprovaram a eficiência dos substratos no que diz respeito à homogeneidade quando comparados com a técnica até então utilizada (*drop-casting*), sem a utilização do ímã. Esse resultado foi importante, pois concluiu um dos objetivos específicos desse trabalho que era produzir substratos ferromagnéticos com auxílio de um ímã de tal forma que essa composição tivesse um impacto relevante na homogeneidade, o que de fato aconteceu.

#### 4.4 TEM

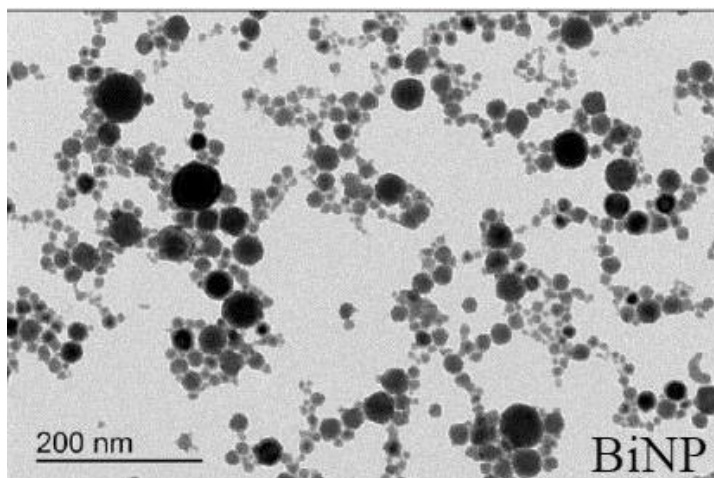
A fim de avaliar os tamanhos das nanopartículas e comparar com os resultados obtidos pela técnica de DLS, foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Transmissão, cuja resolução é, em geral, muito superior àquela do DLS.

Análises com nanopartículas sintetizadas de todos os elementos foram realizadas, conforme mostra a Figura 29.

Figura 29 - Microscopia de transmissão das nanopartículas de Ni, Co e Bi, respectivamente.





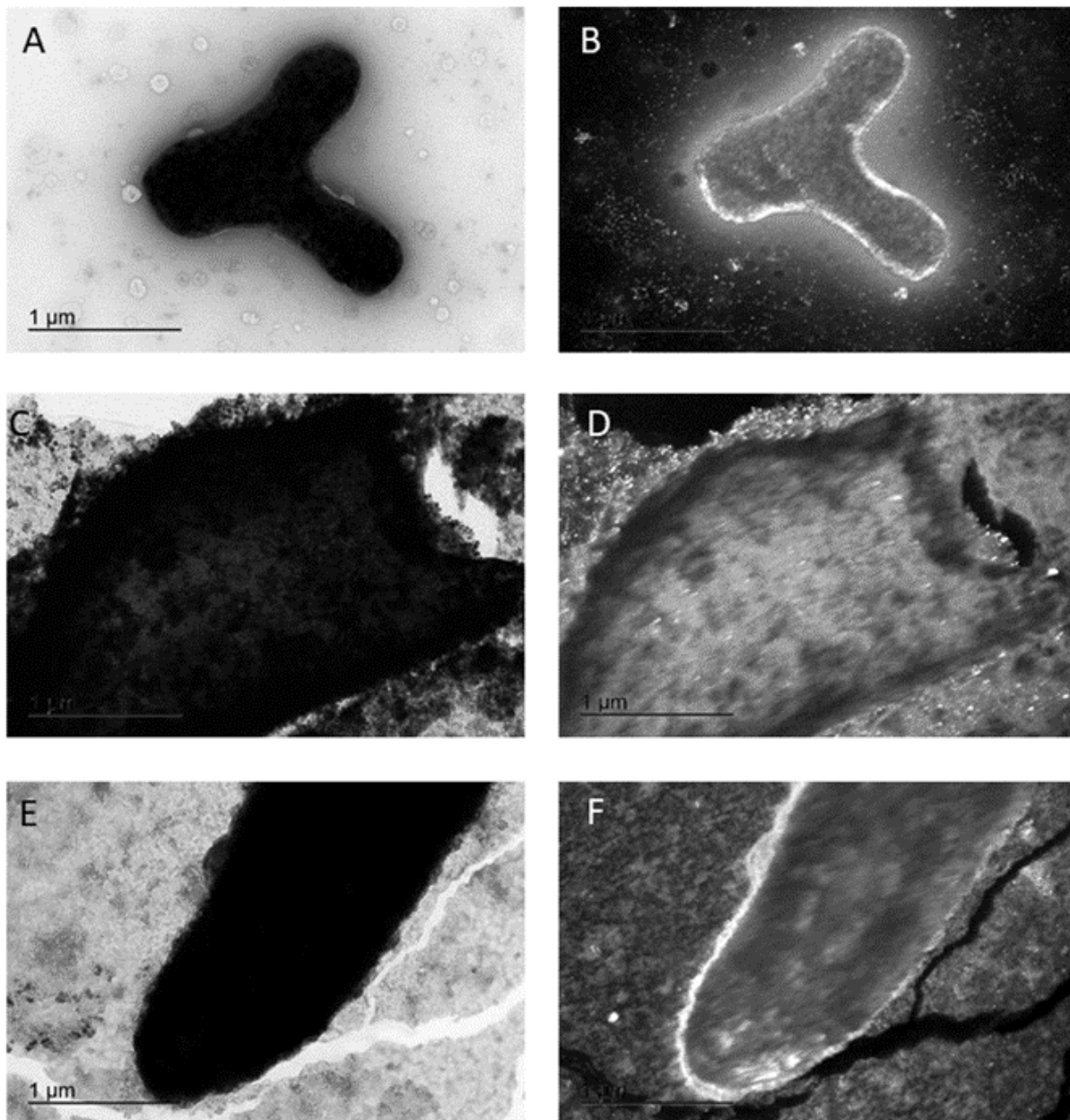


Fonte: A autora (2018)

As medidas realizadas no microscópio de transmissão (TEM) mostram que essas nanopartículas são todas esféricas, sendo que as nanopartículas de Co e Ni tendem a apresentar diâmetros menores, com as de Co tendo uma menor dispersão, enquanto que as de Bi apresentam maior dispersão de tamanhos e também algumas partículas maiores. Estes dados estão em acordo com os tamanhos médios medidos por DLS.

O microscópio de transmissão foi fundamental para verificação de outro passo importante do trabalho: a interação das nanopartículas com alguns dos microrganismos testados, os fungos. Por meio das medidas de TEM pode-se avaliar como as nanopartículas se distribuem na parede dessas amostras, verificar se eram internalizadas, se ficavam na superfície ou se haveria algum outro tipo de interação. No caso destas medidas, tendo em vista aspectos relacionados à coordenação da preparação das nanopartículas e dos fungos e ao tempo disponível para uso do microscópio, optou-se por utilizar as nanopartículas de cobalto, porque os resultados foram mais facilmente visualizáveis. Além disso, conforme será demonstrado nas seções seguintes, o cobalto permitiu a realização de experimentos (com fungos) em que o efeito SERS foi mais pronunciado do que com os outros materiais. É possível que os tamanhos menores e a menor dispersão das nanopartículas de cobalto tenham associação a este efeito. Na Figura 30 são apresentadas imagens de TEM em que se observa a distribuição das nanopartículas de cobalto em diferentes gêneros e espécies de fungos.

Figura 30 - Microscopia eletrônica de transmissão para fungos hialinos e dematiáceos em solução aquosa com nanopartículas de cobalto depositadas na superfície de estruturas reprodutivas e vegetativas. A e B- Conídio da espécie *Fusarium oxysporum* em campo claro e escuro respectivamente; C- Fragmento de hifa da espécie *Fonsecaea pedrosoi* em campo claro e campo escuro (D); E- Fragmento de hifa da espécie *Fonsecaea pugnacius* em campo claro e escuro (F).



Fonte: A autora (2019)

Esses resultados são interessantes e constituem uma das principais contribuições do presente trabalho, porque evidenciam que as nanopartículas ficam

ligadas especialmente na região imediatamente ao redor da parede do fungo, não sendo internalizadas. Isto que significa que, quando as amostras forem analisadas por espectroscopia Raman, os sinais SERS referentes ao aumento de campo (pela presença das nanopartículas) deverão estar associados a moléculas que estão presentes na parede do fungo e não em estruturas internas. Portanto, abre-se caminho para diferenciar fungos, caso seja possível distinguir estruturas de paredes que sejam características de cada espécie, por exemplo.

Para complementar os experimentos de TEM e evidenciar a composição das nanopartículas foram utilizadas as técnicas de MEV e EDS. Com estas também foi possível avaliar a aparência dos fungos no sentido topográfico. A próxima seção apresenta com detalhes esses resultados.

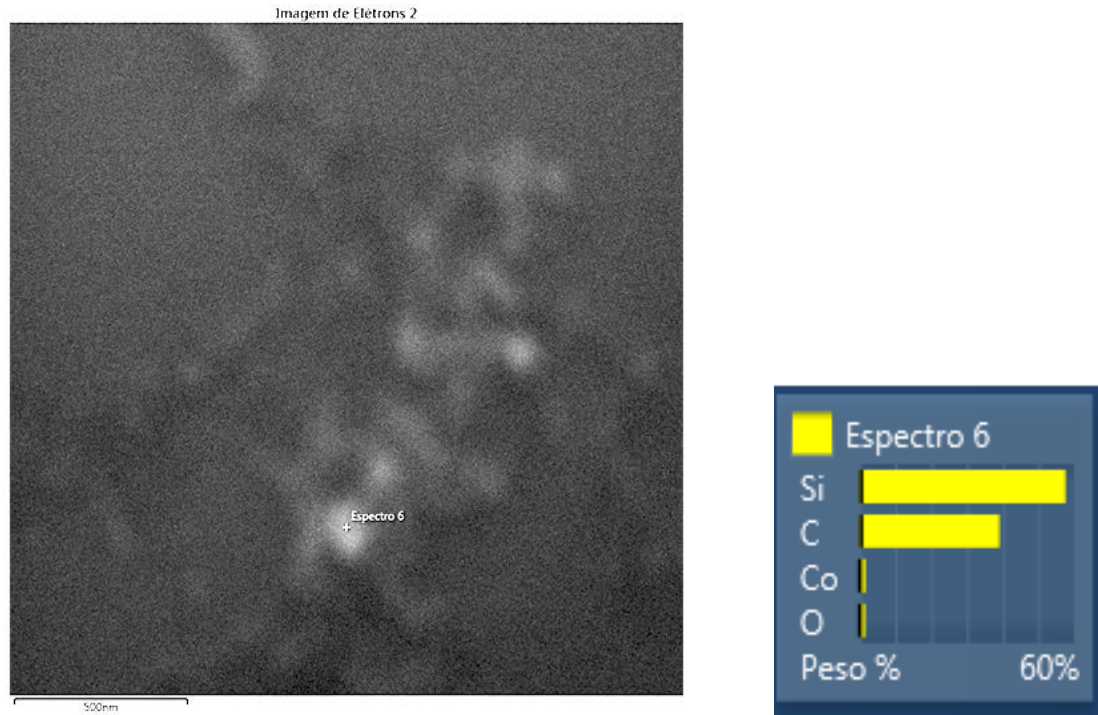
#### 4.5 Composição estrutural e relação nanopartícula/microrganismos (MEV e EDS)

O MEV e o EDS foram ferramentas essenciais para confirmar a presença de nanopartículas integradas às paredes dos fungos. Devido ao tamanho pequeno das nanopartículas, especialmente o Co, torna-se um desafio reconhecer as pequenas esferas nas imagens, mesmo com o equipamento operando em sua maior faixa de resolução, porém, por meio do EDS é possível determinar os elementos químicos presentes. Além disso, os ensaios foram realizados para visualizar as estruturas fúngicas que contribuiu para elucidar outros pontos fundamentais para a conclusão do projeto.

O EDS mostra o resultado da composição química das amostras, tanto as nanopartículas isoladas, quanto interagindo com a parede dos fungos. A técnica de EDS confirmou que, de fato, as nanopartículas produzidas têm o mesmo material dos alvos usados para a ablação (bulk). A Figura 31 mostra o resultado da análise das nanopartículas de Co e de Ni, com as quais a maioria dos experimentos Raman/SERS foi realizada. Ressalta-se aqui o fato dessas amostras terem sido preparadas sobre substratos de sílica, pois era uma exigência para melhorar a eficiência do equipamento. As imagens não são muito nítidas porque a resolução do MEV é baixa, em relação ao

tamanho das nanopartículas, porém, é possível perceber as regiões nas quais as nanopartículas estão distribuídas na forma de aglomerados.

Figura 31 - Esquerda: MEV de um filme com nanopartículas de Co, indicando a região em que foi feito o EDS; Direita: resultado da composição na região escolhida.

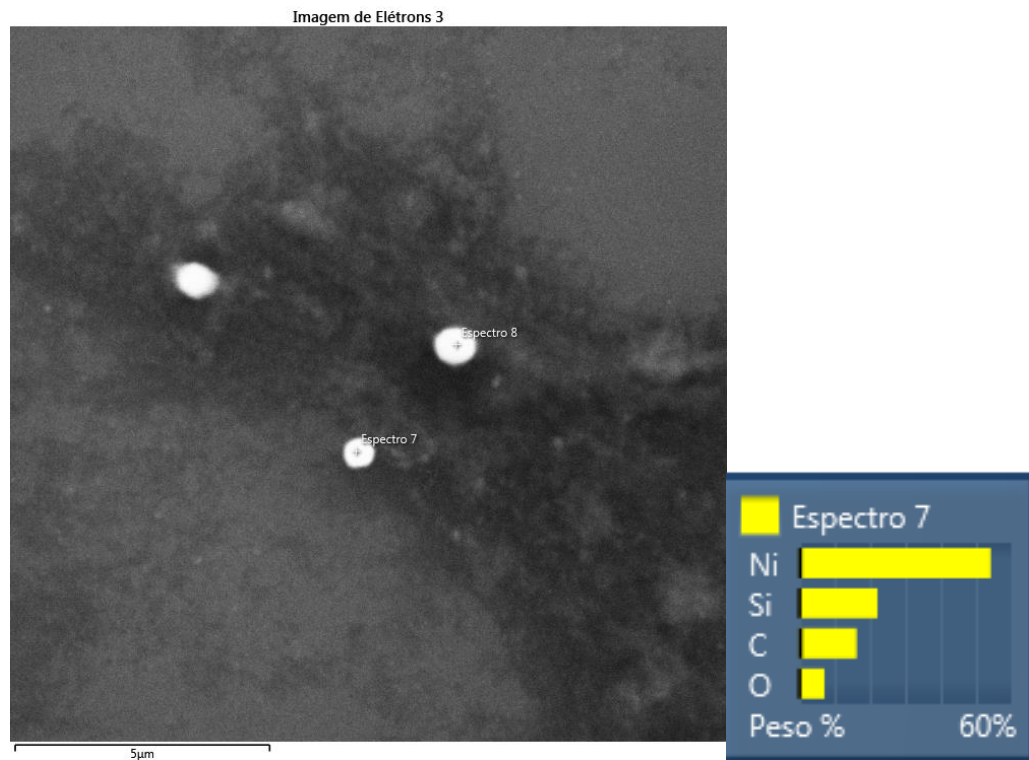


Fonte: A autora (2018)

Percebe-se, na Figura 31, que a composição indica presença de silício (Si), carbono (C), cobalto (Co) e oxigênio (O). Este resultado era esperado, porque para essa análise foi utilizado o substrato de sílica e, devido à alta sensibilidade do equipamento, o pó do ambiente pode ter se acumulado no substrato de tal forma que houve indícios de matérias orgânicas (C e O). O importante desta medida é notar que, além dos demais elementos, destaca-se a presença de Co, ou seja, além do substrato de sílica, há apenas cobalto sobre o substrato.

A mesma análise foi estendida para o filme de Ni, conforme mostrado na Figura 32:

Figura 32 - Esquerda: MEV de um filme com nanopartículas de Ni, indicando a região em que foi feito o EDS; Direita: resultado da composição na região escolhida.



Fonte: A autora (2018)

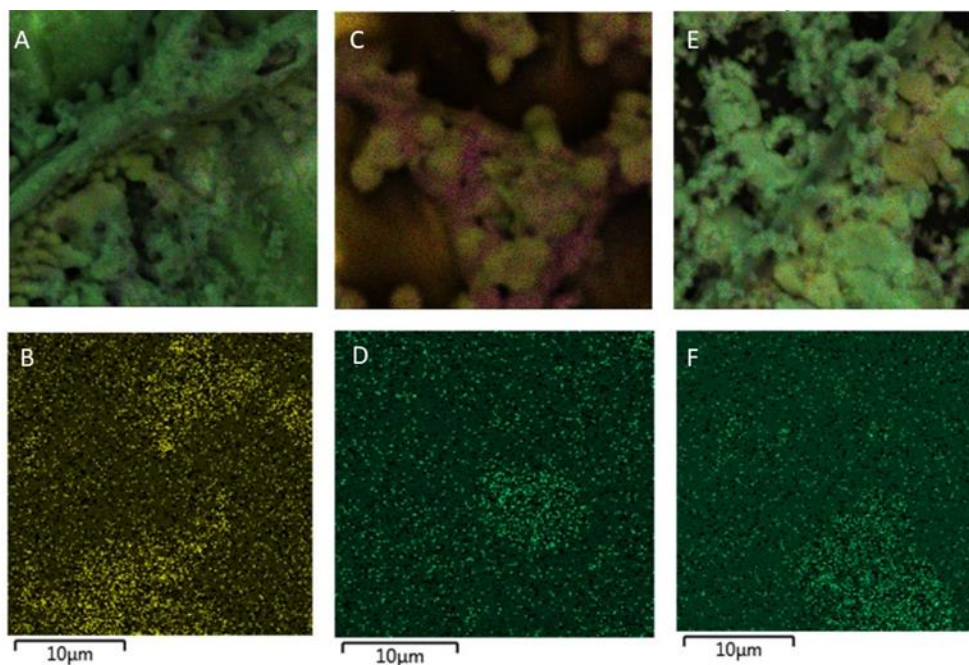
A imagem dos filmes de Ni é um pouco mais nítida que a dos filmes de Co, talvez porque a dispersão de tamanhos encontrada no coloide de Ni seja maior. Neste sentido, foi mais fácil selecionar uma região contendo um aglomerado de nanopartículas para a realização do EDS. Neste caso, os resultados ficaram mais evidentes para a visualização se comparados com os do cobalto. Como já mencionado, é natural que apareça Si, C e O além do elemento que constitui a nanopartícula. Assim, aqui também fica evidente que a composição da nanopartícula é exatamente a mesma do bulk, comprovando que não há outro tipo de metal no substrato. Desta maneira, os substratos podem ser utilizados nos experimentos com a garantia de que os eventuais efeitos de aumento de campo observados serão devidos aos metais componentes das nanopartículas.



Foi realizada também a análise da interação entre a parede dos fungos e as nanopartículas. Porque os resultados dos experimentos SERS com o cobalto foram mais interessantes, optou-se por realizar as análises que seguem somente com as nanopartículas de Co.

O objetivo dessa análise era verificar onde as nanopartículas se aglomeravam e se era possível identificar via EDS quais elementos estariam presentes. Na Figura 33 são apresentadas algumas das imagens de MEV em que gotas ( $2\mu\text{l}$ ) de nanopartículas de cobalto foram depositadas sobre lâminas com diversos fungos.

Figura 33 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) – imagens na parte superior. Energia Dispersiva em Raios-X (EDS) – imagens na parte inferior evidenciando a presença das nanopartículas de cobalto (pontos brilhantes) depositadas sobre os fungos. *Fusarium oxysporum*: A- MEV e B- EDS; *Fonsecaea pugnacius*: C- MEV e D- EDS; *Fonsecaea pedrosoi*: E- MEV e F- EDS

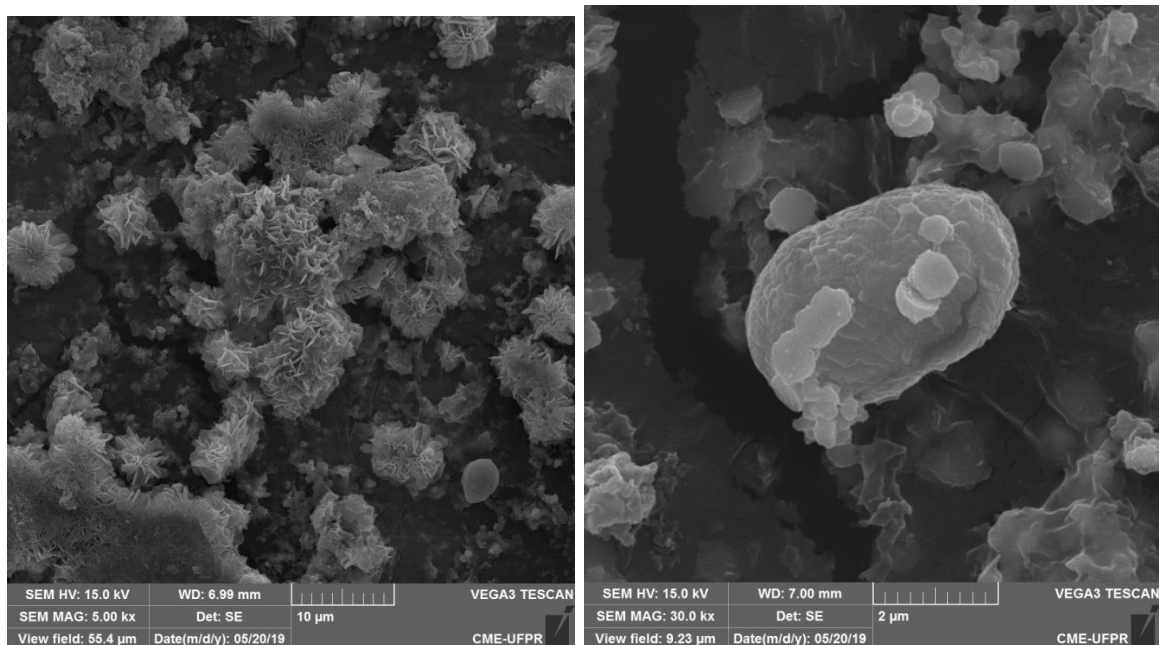


Fonte: A autora (2019)

Como é possível observar, o MEV permite visualizar estruturas dos fungos e o EDS revela a distribuição das nanopartículas em toda a região analisada. A Figura 34

apresenta apenas os fungos, por sua vez, possibilita melhor visualizar um dado importante desse tipo de ser vivo: as irregularidades das paredes.

Figura 34 - Microscopia de varredura de amostras de *Candida tropicalis* evidenciando os subprodutos e estruturas filamentosas que são excretadas na parede do fungo.



Fonte: CME, UFPR (2019)

Esses filamentos, que parecem estar saindo do fungo são um dos mecanismos de defesa da parede, cuja constituição é basicamente açúcares, proteínas e quitina (MAQUELIN *et al.* (2002); NOOTHALAPATI *et al.* (2016)). Isso será importante na discussão dos resultados Raman/SERS.

#### 4.5. Substratos SERS

Os substratos foram produzidos tanto com lâminas de vidro quanto em silício, ambos com a mesma metodologia (depositando gotas dos coloides de nanopartículas e deixando secar em uma estufa a 25 graus Celsius). A Figura 35 mostra uma sequência com as nanopartículas, a lâmina sobre o imã (com o depósito das gotas) e uma imagem ilustrativa do resultado final, após a secagem.

Figura 35 - Imagem dos coloides de nanopartículas (esquerda), do substrato de vidro sobre o ímã com gotas (2  $\mu$ l) depositadas (centro) e o substrato já seco e pronto para uso, após secagem por 24h.



Fonte: A autora (2018)

Conforme mostrado na Figura 35, a última imagem representa o substrato já seco e pronto para aplicação, sendo que cada região possibilita a análise de um analito, ou seja, com um substrato como este, podem ser realizadas seis análises SERS distintas, salientando-se que os analitos em solução aquosa são depositados em gotas sobre cada região do substrato. Esses substratos, além de homogêneos, como a perfilometria e as microscopia demonstram, também são pequenos e de fácil manuseio, o que se encaixa perfeitamente com as propostas de diagnóstico rápido (porque basta “pingar” uma gota do analito e realizar um espectro durante alguns segundos) e *point-of-care* (porque os espectros podem ser obtidos utilizando espectrômetros portáteis).

Foram produzidos substratos em silício e em vidro, para que os testes fossem os mais amplos possíveis. Além disso, o diâmetro das gotas foi adotado como padrão, pois eram sempre depositados dois microlitros de coloides de nanopartículas, dessa forma os substratos foram padronizados, a fim de que houvesse uma padronização em todas as análises SERS realizadas.

#### 4.6. Espectroscopia RAMAN/SERS

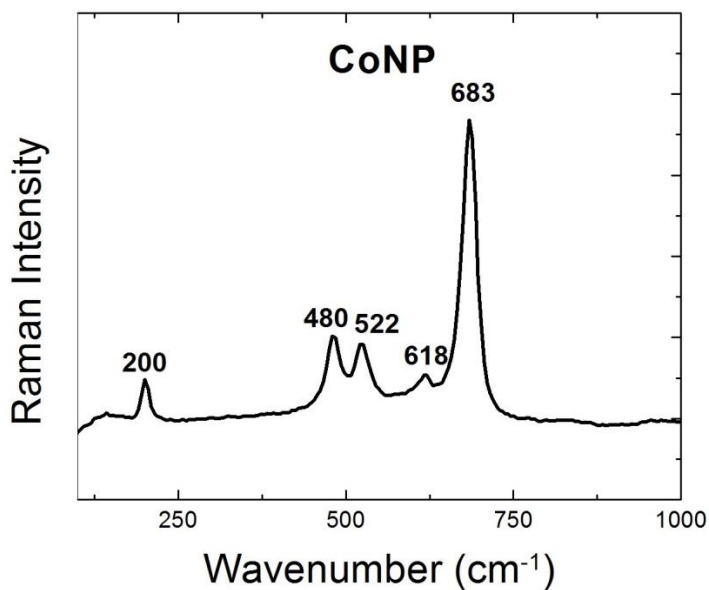
Nesta seção, são apresentados os resultados referentes ao uso das nanopartículas sintetizadas por ablação a laser – e dos substratos produzidos com elas



– na realização de experimentos SERS. Para tal, as nanopartículas foram testadas por meio de dois procedimentos experimentais distintos: 1- o denominado “gota-gota”; e 2- depositando a amostra no substrato, ou “gota-substrato”. No procedimento “gota-gota”, uma gota (1 a 2  $\mu\text{l}$ ) contendo nanopartículas foi misturada a uma gota (1 a 2  $\mu\text{l}$ ) contendo o analito sobre uma lâmina de vidro. Esta mistura foi deixada para secar (em um processo que dura tipicamente dois ou três minutos) e, em seguida, foi feita a leitura (ou interrogação) utilizando o espectrômetro (BEZERRA Jr. *et al*, 2017, 2018). No caso do depósito sobre o substrato, a gota do analito (1 a 2  $\mu\text{l}$ ) foi depositada diretamente no substrato e, após secagem, feita a medição no espectrômetro Raman.

Uma das características mais especiais da nanopartícula de cobalto é sua propriedade de “fazer SERS se si mesma”, ou seja, ocorre uma amplificação do sinal Raman do cobalto por conta da existência dos hot spots associados às próprias nanopartículas de Co. Nosso grupo propõe batizar este efeito de “empty hot spots”, dado que os *hot spots* não contêm moléculas de analitos, mas apenas o próprio material das nanopartículas. Isso é fundamental para um registro de assinatura interna, que permite a identificação do efeito SERS em todas as amostras que foram medidas. A Figura 35 mostra o espectro SERS do filme de Co sem analito:

Figura 36 - Espectro Raman/SERS associado à nanopartículas de Co.

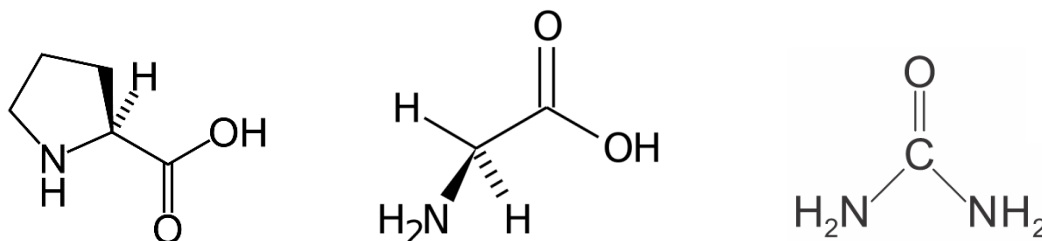


Fonte: A autora (2018)

O espectro da Figura 36 é caracterizado por vibrações (fônons) típicas de óxido de cobalto, particularmente o  $CoO$  e  $Co_3O_4$ , o que está em acordo com a literatura (LI *et al.*, 2016; MOCK *et al.*, 2016; ANSARI *et al.*, 2017). Neste espectro, destaca-se o pico em  $683\text{ cm}^{-1}$ , identificado como a excitação de um modo normal de vibração nomeado fônnon  $A_{1g}$ .

O procedimento para realização dos testes seguiu uma escala de complexidade molecular e química dos analitos. Primeiro foram mensurados dois aminoácidos, prolina e glicina, então, a ureia e depois os fungos. As três primeiras moléculas são apresentadas na Figura 37. Por conta dos resultados iniciais, optou-se por apresentar os dados mais significativos, no contexto dos experimentos. Portanto, serão apresentados principalmente os resultados referentes a cobalto e níquel, com menos destaque para o bismuto. Particularmente, as nanopartículas de cobalto se mostram muito eficientes em todos os experimentos SERS e, por isso, foram adotadas para a maioria dos experimentos com fungos.

Figura 37 - moléculas de interesse biológico utilizadas como analitos para verificação de efeito SERS com nanopartículas de Ni, Co e Bi. Prolina (esquerda), Glicina (centro) e Ureia (direita).

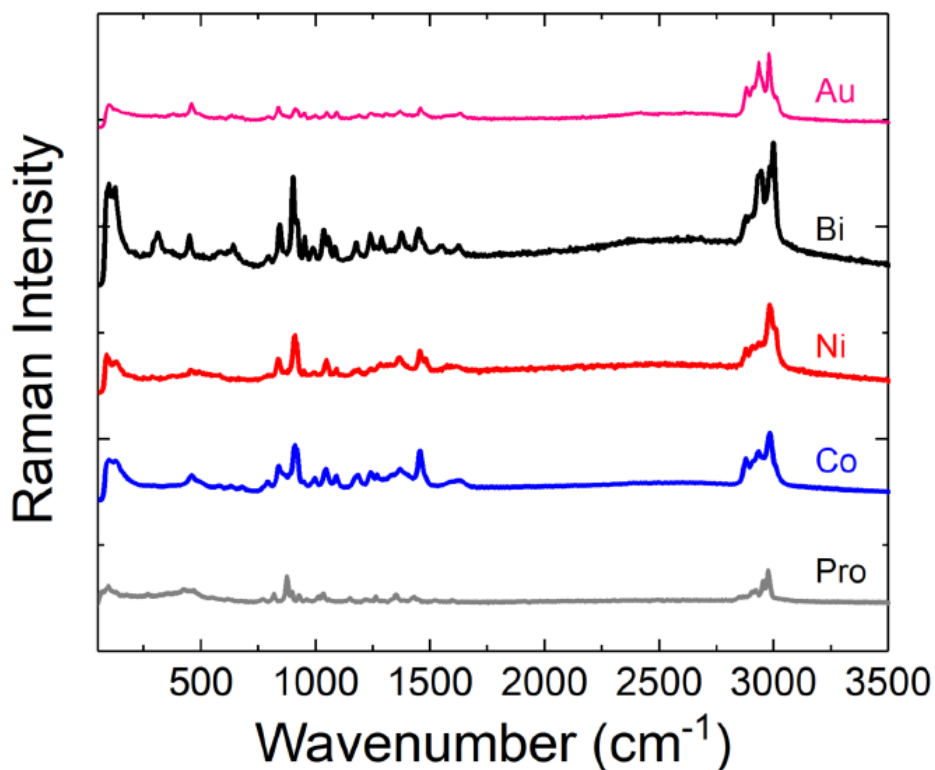


Fonte: A autora (2019)

O teste com o aminoácido prolina (PRO) buscou evidenciar o efeito SERS usando as nanopartículas desenvolvidas, com o procedimento “gota-gota”. O primeiro teste foi feito com a prolina, conforme indicado na Figura 38, que é uma molécula relativamente simples e cujos picos característicos já haviam sido determinados por nosso grupo, usando nanopartículas de bismuto (BEZERRA JR. *et.al.*, 2017). De fato, observa-se uma região com grande densidade de picos entre  $500\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ , conhecida como “fingerprint region”, que contém as bandas de vibração Raman usadas

para identificar aminoácidos e moléculas biológicas em geral. Existe também um conjunto de bandas de maior energia, depois de  $2900\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo principalmente a vibrações (“stretching modes”) de radicais CH and  $\text{CH}_2$ .

Figura 38 - Espectro Raman da prolina (abaixo, em cinza) em alta concentração e espectros SERS em solução aquosa na presença de nanopartículas de Co, Ni, Bi e Au.



Fonte: A autora (2018)

Na Figura 38, a curva cinza mostra o espectro Raman da PRO com uma concentração de  $50\text{ mM}$ . Essa concentração foi reduzida via diluição em água ultrapura tanto quanto não se pudesse mais visualizar sinal Raman algum para dada configuração do microscópio (potência do laser, lente utilizada para focalização e tempo de aquisição), em seguida uma gota dessa mesma amostra com baixa concentração foi testada com as nanopartículas de Co, Ni, Bi e Au (este para servir de base de comparação), respectivamente. Os espectros correspondem a uma potência do laser de

10mW, com a focalização de uma lente de 50x, tempos de aquisição da ordem de 0,5 segundo e aproximadamente 100 acumulações.

Claramente, o efeito SERS foi observado para todas as nanopartículas, mesmo para concentrações muito baixas (<1mM), portanto, as nanopartículas de Ni, Co e Bi possibilitaram a amplificação do sinal Raman, conforme objetivo inicial do projeto. Isso comprova que os substratos servem para a realização de experimentos SERS. Além disso, o mais fundamental diante da proposta desse trabalho foi que as nanopartículas coloidais de metais “alternativos” tiveram uma resposta comparável a um material mais tradicional (e caro), o ouro, que é comumente utilizado em experimentos SERS. Tendo em vista a magnitude dos sinais SERS observados e usando a metodologia proposta por Bezerra Jr. *et al.* (2017) estimamos que os fatores de aumento desses materiais estejam em uma faixa entre  $10^{10}$  a  $10^{11}$ .

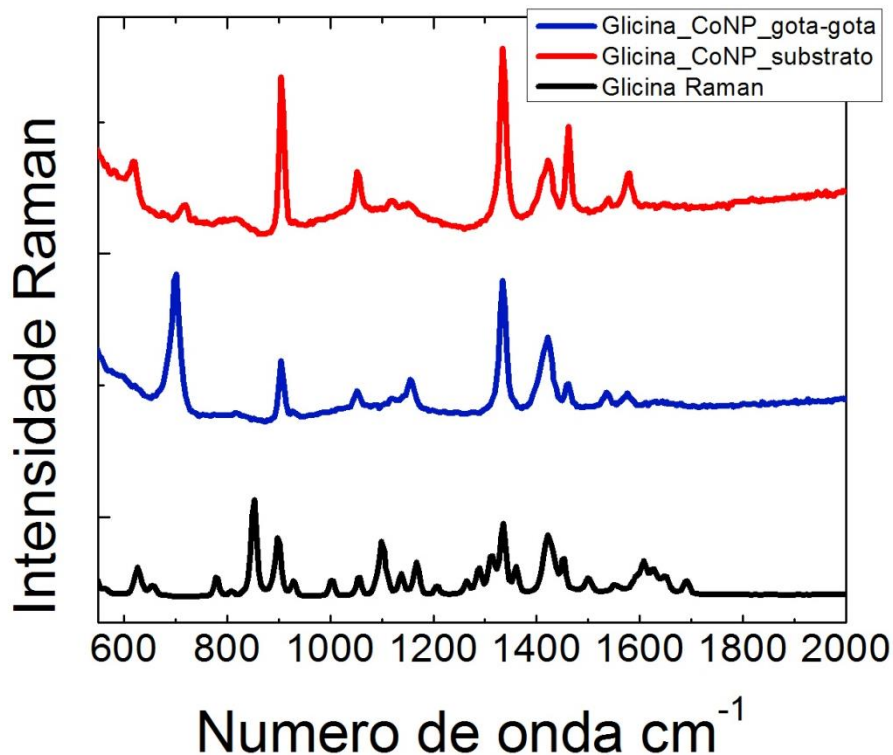
O espectro SERS para cada molécula apresenta, em geral, mudanças nos picos (intensidade, frequência e largura de picos) em relação aos sinais Raman da molécula. Essas alterações espectrais são uma característica comum do efeito SERS e dependem de interações específicas entre a molécula testada e as nanopartículas, bem como da orientação relativa da molécula e da disposição (aumento eletromagnético) da molécula nos *hot spots* (FARCAU e ASTILEAN., 2010; BEZERRA Jr. *et al.* 2017, 2018).

Alterações significativas podem ser observadas nos espectros SERS da prolina nas bandas com maior frequência, na região em torno de  $2980\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, as bandas de vibração do  $\text{CH}_2$ , em torno de  $1450\text{ cm}^{-1}$ , são mais fortes nos espectros SERS.

As vibrações de alongamento do anel (“ring stretching”) próximas a  $900\text{ cm}^{-1}$  (BEZERRA Jr. *et al.*, 2017) também são deslocadas e intensificadas no SERS. Outra informação importante refere-se a uma vibração de  $\text{OH}$  fora do plano em torno de  $930\text{ cm}^{-1}$  no espectro Pro Raman (MARYA *et al.*, 2009), que não está presente em nenhum espectro SERS. Pode ser uma indicação de uma interação mais forte entre a PRO e os metais das nanopartículas através do grupo molecular  $\text{OH}$ . Mais experimentos e cálculos de simulação com base em modelos de química quântica podem ser necessários para explicar exatamente o que acontece nesses experimentos.

Na sequência, vide Figura 39, são apresentados resultados de experimentos SERS para com o procedimento “gota-gota” e “gota-substrato” com nanopartículas de cobalto, utilizando como molécula de teste a glicina (GLI).

Figura 39 - Espectro Raman (curva em preto) e SERS da glicina usando nanopartículas de cobalto e os procedimentos “gota-gota” (curva azul) e “gota-substrato” (curva vermelha).



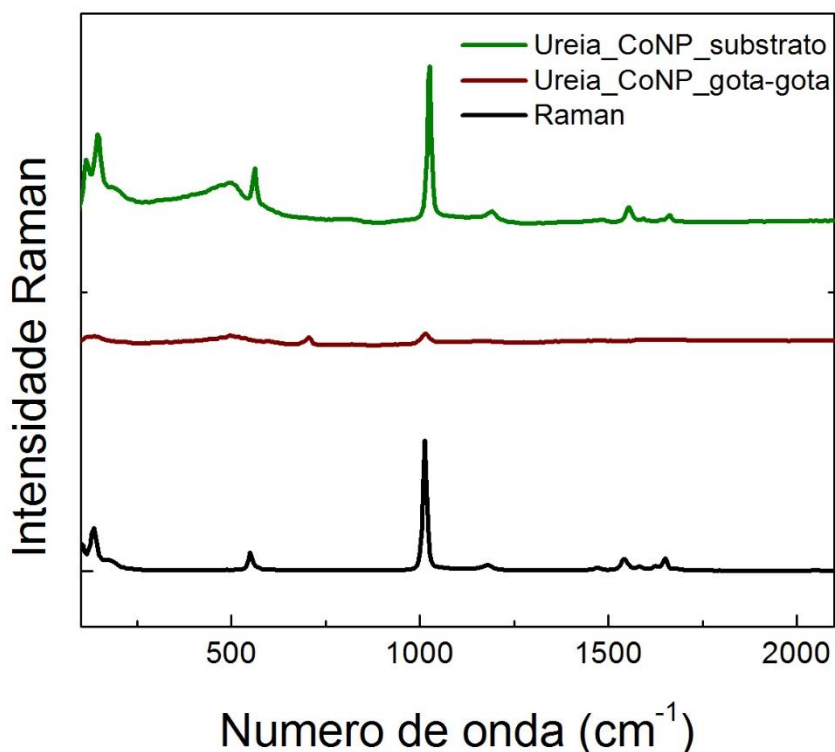
Fonte: A autora (2018)

Aqui fica evidente que há diferenças entre os espectros, especialmente na intensidade relativa de alguns picos, isso porque a distribuição mais homogênea das nanopartículas no substrato garante mais *hotspots* disponíveis para que a molécula se assente e assim as interações com *hotspots* são diferentes nos dois métodos. Este resultado demonstra que tanto o procedimento “gota-gota” quanto o “gota-substrato” são eficientes para a realização de experimentos SERS. Portanto, cada um dos dois procedimentos poderá ser empregado, dependendo de situações experimentais específicas.

Um experimento SERS análogo foi realizado com a ureia servindo de molécula de teste. A ureia é um analito importante em exames médicos para diagnóstico de doenças renais, por exemplo, além de ser um parâmetro para exames antidoping e controle de uso de drogas. É um analito interessante a ser utilizado no desenvolvimento de testes para diagnóstico SERS do tipo não invasivo (LEORDEAN *et al.*, 2012).

Na Figura 40, observa-se o espectro Raman típico da ureia, bem como os espectros SERS correspondentes aos experimentos “gota-gota” e “gota-substrato” com nanopartículas de cobalto.

Figura 40 - Espectro SERS da ureia nos experimentos “gota-gota” e “gota-substrato”. Abaixo, o espectro Raman característico da ureia.



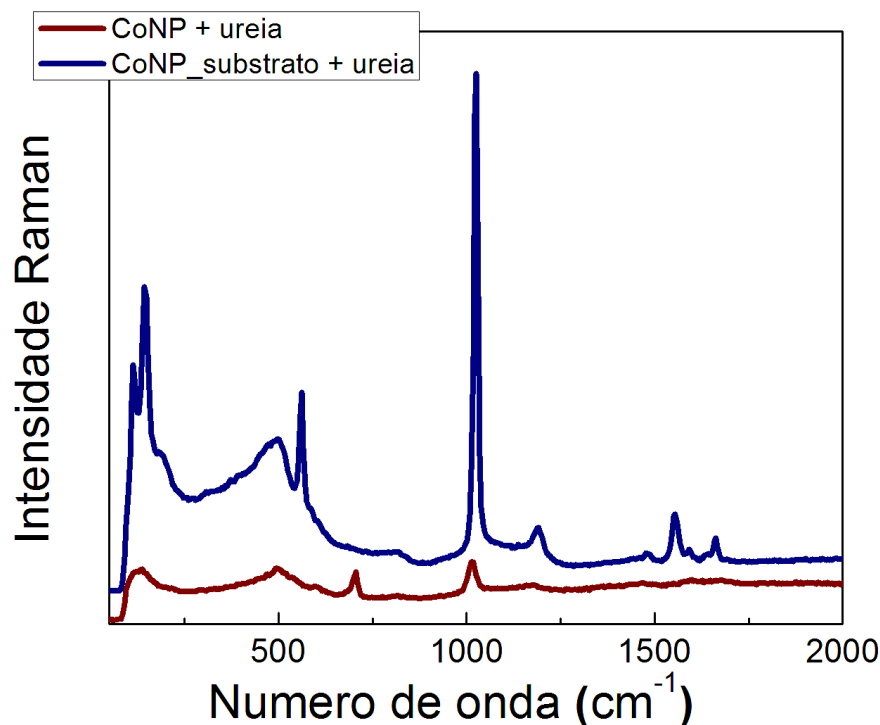
Fonte: A autora (2019)

A curva em preto da Figura mostra o sinal Raman da ureia em uma concentração alta, já as curvas em bordô e verde são respostas SERS, respectivamente, dos exames “gota-gota” e “gota-substrato”. Ambos os testes SERS estavam com uma concentração de 0,5 mM, ou seja, uma concentração não detectável pela técnica Raman

convencional. Nota-se, portanto que o efeito das nanopartículas possibilitou a visualização do espectro SERS, o que comprova que estas nanopartículas apresentam potencial para a realização de biotestes. É evidente também que o sinal, apesar de coletado de uma amostra com concentração muito baixa, teve o espectro ampliado sobre o substrato de CoNP, sendo que o substrato apresentou um maior aumento de sinal neste caso.

Os espectros da ureia são dominados por um modo de vibração simétrico do grupo N-C-N (symmetric bond stretch) na região de  $1000\text{ cm}^{-1}$ . (LEORDEAN *et al.*, 2012). Uma imagem mais clara da diferença entre a técnica “gota-gota” e o efeito dos substratos ferromagnéticos está na Figura 41.

Figura 41 - Espectro SERS da ureia para efeito de comparação: “gota-gota” e “gota-substrato”.



Fonte: A autora (2019)

Nesta comparação, a amplificação do sinal SERS no substrato foi  $10^3$  vezes maior que no método “gota-gota”. É provável que a interação da molécula de ureia com

o substrato produza alguma espécie de interação, por conta do caráter quase planar da molécula, que provoca um alinhamento das moléculas e consequente aumento de sinal SERS.

Para estimar os fatores de aumento é possível fazer as contas com uma equação bem simples, a fim de comparar o sinal do pico em torno de  $1000\text{ cm}^{-1}$  para a medida Raman e o mesmo pico no caso do experimento SERS “gota-substrato” (vide Figura 41):

$$EF = \frac{\frac{I_{SERS}}{N_{SERS}}}{\frac{I_{Raman}}{N_{Raman}}} \quad (8)$$

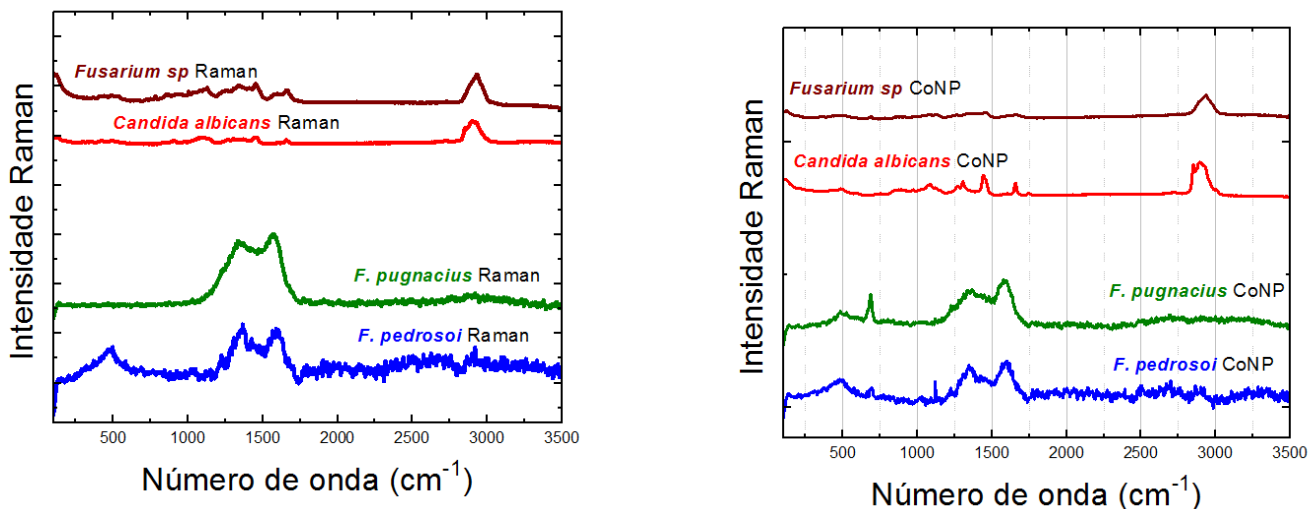
Em que  $I$  são as intensidades dos picos e  $N$  são os números de moléculas (nos experimentos SERS e Raman, respectivamente). Esse fator de aumento também é da ordem de  $10^{11}$  (BEZERRA *et al.*, 2017; NADAS, 2019), evidenciando o potencial da técnica SERS e a eficácia dos substratos produzidos.

A última etapa de aplicação das nanopartículas e substratos desenvolvidos neste trabalho consistiram em utilizá-las em testes SERS em experimentos com o intuito de detectar e diferenciar amostras de fungos hialinos (*Candida* spp. e *Fusarium oxysporum*) e das leveduras negras de origem clínica *Fonsecaea pedrosoi* CBS271.37, *F. monophora* CMRP2543, CBS, *F. pugnacius* CBS139.214, e ambiental, *F. erecta* CBS125.763.

Na Figura 42 podem ser observados alguns espectros típicos, tanto Raman quanto SERS. As espécies *C. albicans* CMRP851 e *Fusarium oxysporum* CMRP1913 foram utilizadas como padrão de referência, para efeito de comparação com base na literatura existente acerca de espectros Raman/SERS relacionados a esses organismos (MAQUELIN *et al.*, 2002; NOOTHALAPATI *et al.*, 2016).



Figura 42 - Dados SERS dos fungos hialinos: *Fusarium sp.*, *Candida albicans*, e negros: *Fonsecaea pugnacius* e *Fonsecaea pedrosoi*.



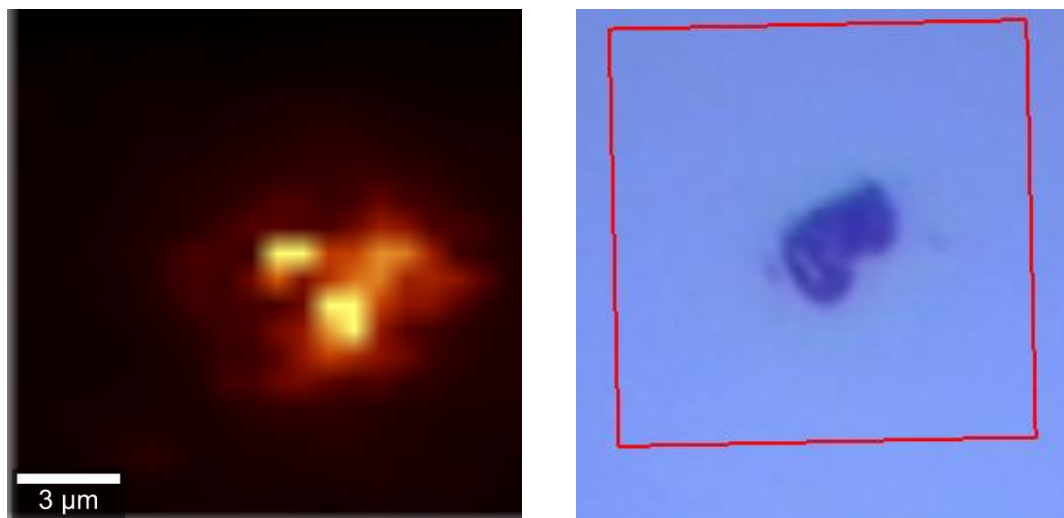
Fonte: A autora (2019)

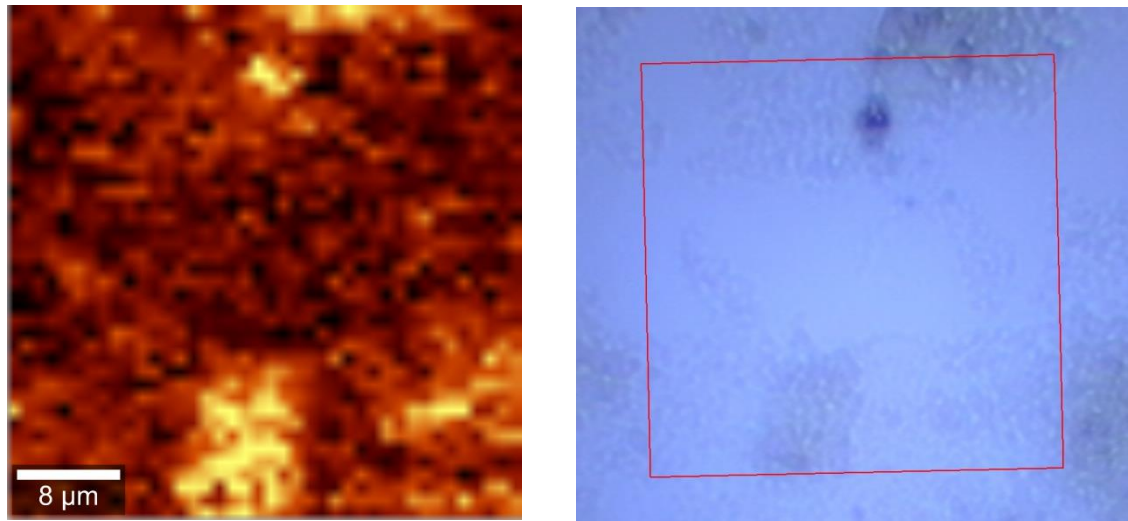
A partir dos resultados apresentados, verificou-se a distinção entre os sinais Raman/SERS dos fungos negros em relação aos hialinos. Observa-se que a presença de nanopartículas produz SERS característicos, por exemplo, o sinal na região de  $1115\text{ cm}^{-1}$  observado para *F. pedrosoi*. Entretanto, este pico não foi observado nas demais linhagens das espécies em estudo, representando assim, um sinal possivelmente espécie-específico, o qual indicava a presença de uma ligação entre carbono e oxigênio ( $C - O$ ), o que pode estar relacionado às estruturas polissacarídicas da parede, o que ainda requer mais experimentos e maiores estudos. De fato, a Figura 42 indica que a caracterização dos fungos hialinos via Raman/SERS tem maior potencial do que aquela dos fungos negros, dado que estes apresentam uma disposição a carbonizar com facilidade, o que certamente está associado à presença de melanina (característica desses fungos negros). As bandas observadas para os fungos negros na região em torno de  $1500\text{ cm}^{-1}$  indicam carbono amorfo (queima da amostra), cuja região espectral coincide com alguns dos picos da melanina e de outros componentes da parede dos fungos. Para solucionar esse problema e possibilitar a distinção dessas espécies será necessário um trabalho mais minucioso que não está no

escopo do presente estudo, mas que deve ter desdobramento em projeto de doutorado futuro.

Dada a dificuldade de comprovar o SERS pelos espectros da Figura 42, optou-se por investigar a distribuição das nanopartículas nas regiões (da gota) contendo fungos. Para isso, foram gerados mapas Raman das espécies *Fonsecaea pedrosoi* e *Fonsecaea pugnacius*, ambas com cobalto, como indica a Figura 42. Nestes mapas, à esquerda da Figura, os pontos em amarelo representam as vibrações do cobalto, em torno de  $680\text{cm}^{-1}$  (vide Figura 36); à direita, é mostrada uma imagem do microscópio ótico na qual as partes mais escuras representam a presença de células de fungos.

Figura 43 - Mapa Raman *Fonsecaea pedrosoi* e *Fonsecaea pugnacius*, respectivamente. À esquerda: sinal Raman do pico característico do cobalto, em  $680\text{ cm}^{-1}$ . À direita: imagem ótica dos fungos.



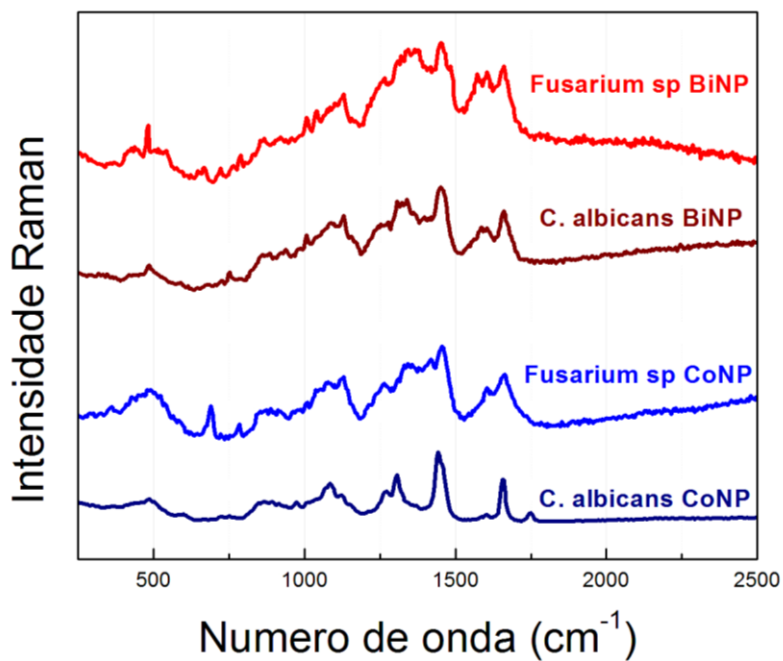


Fonte: A autora (2019)

Os pontos com maior intensidade representados em amarelo indicam os *hotspots*, ou seja, regiões em que pode haver sinal SERS. Com essas imagens, verifica-se que há muitos *hot spots* sobre a estrutura desses microrganismos, o que é compatível com as imagens feitas por meio de microscopia de transmissão (vide Figura 30). Isso garante que não só é possível fazer SERS de fungos, como também pode haver o potencial de utilizar estes espectros para distinguir gêneros e espécies, ainda que, com os fungos negros, a tarefa seja mais complicada.

Na Figura 44, são apresentados alguns espectros característicos de diversos fungos hialinos. É possível perceber um conjunto de picos que, ainda que guardem relação de proximidade, mesmo a olho nu permitem notar que há distinções. Estas distinções foram observadas em diversos experimentos, o que aponta para a possibilidade de utilização dos espectros SERS para realizar distinção de gêneros, para grupos filogeneticamente distantes como *Candida* e *Fusarium*.

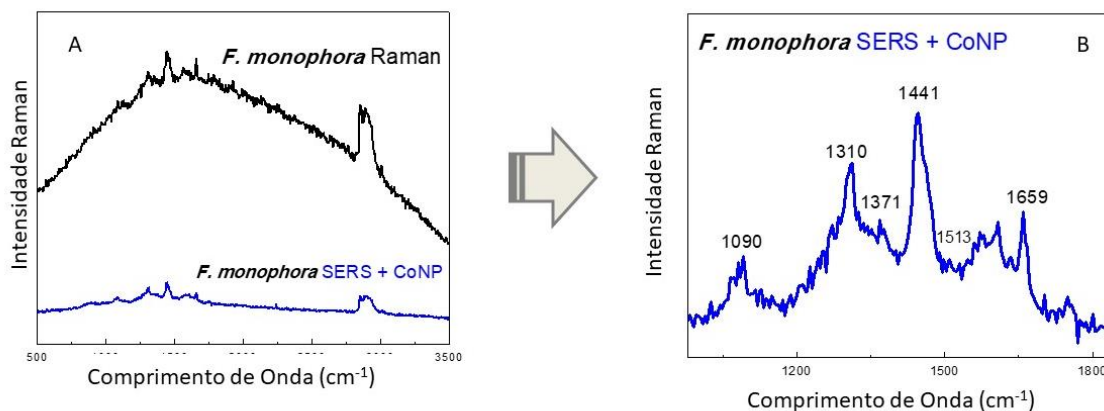
Figura 44 - Espectros SERS dos fungos *Fusarium spp* e *Candida albicans* com diferentes nanopartículas. Note-se que os espectros apresentam similaridades e também diferenças. As diferenças podem ser utilizadas para diferenciação entre os gêneros.



Fonte: A autora (2019)

É importante relatar, nesse contexto, que as leituras SERS para os fungos, por exemplo, a espécie de *F. monophora* (vide Figura 45), utilizando nanopartículas de cobalto, produziu um efeito de redução da fluorescência, definindo assim os picos na região de *fingerprint* que vai de  $1250 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ , com distinções significativas em relação aos outros fungos do mesmo gênero. Regiões entre  $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas à presença de grupamentos  $\text{CH}_2\text{OH}$ . Correlacionando os picos evidenciados na Figura 45 ( $1310, 1371 \text{ e } 1441 \text{ cm}^{-1}$ ) com relatos bibliográficos para as linhagens de procedência clínica CBS 102248 e ambiental CBS 102225 de *F. monophora* pode-se deduzir a presença de carboidratos oriundos da parede celular, como manoses, galactoses e glicoses, conforme observado por Maquelin (2002).

Figura 45 - (A) Espectros Raman e SERS utilizando nanopartículas de cobalto na linhagem CMRP de *Fonsecaea monophora*. (B) a amplificação das regiões entre 1000 – 1800  $cm^{-1}$



Fonte: A autora (2019)

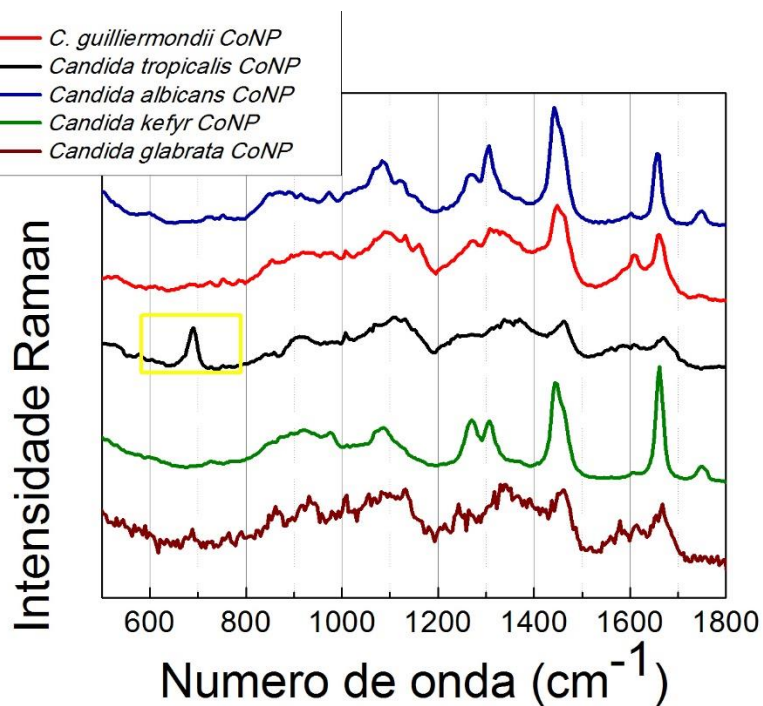
Outra região espectral importante evidenciada está centrada próximo a 2900  $cm^{-1}$ , evidenciando a presença de  $OH$ , e vibrações de mais alta energia, as quais podem também corresponder a grupamentos moleculares presentes na parede celular fúngica.

Na tentativa de organizar uma contribuição inicial relevante, tendo em vista a utilização de SERS para detecção e diferenciação de fungos, buscou-se organizar um protocolo de preparação de amostras para, desta forma, proceder à realização de diversos experimentos com espécies diferentes do gênero *Candida*. Isto permitiu a obtenção de uma série de, pelo menos, quinze espectros para cada amostra analisada. A partir deste conjunto de dados, abre-se a possibilidade da realização de uma análise estatística. Por meio desta análise estatística é que será possível realizar a separação/distinção de fungos por meio da técnica de interrogação ótica proposta via SERS, particularmente com as nanopartículas de cobalto. Este trabalho estatístico deve servir de base para um projeto de doutorado futuro.

Na Figura 46, são apresentados espectros característicos de cinco espécies distintas de fungos do gênero *Candida*. Os espectros são muito semelhantes e, por isso, a análise estatística mencionada acima será de fundamental importância.

Contudo, neste momento, pode-se analisar a Figura 46 como representativa da possibilidade de se obter espectros SERS característicos de fungos, o que constitui um dos objetivos do presente trabalho.

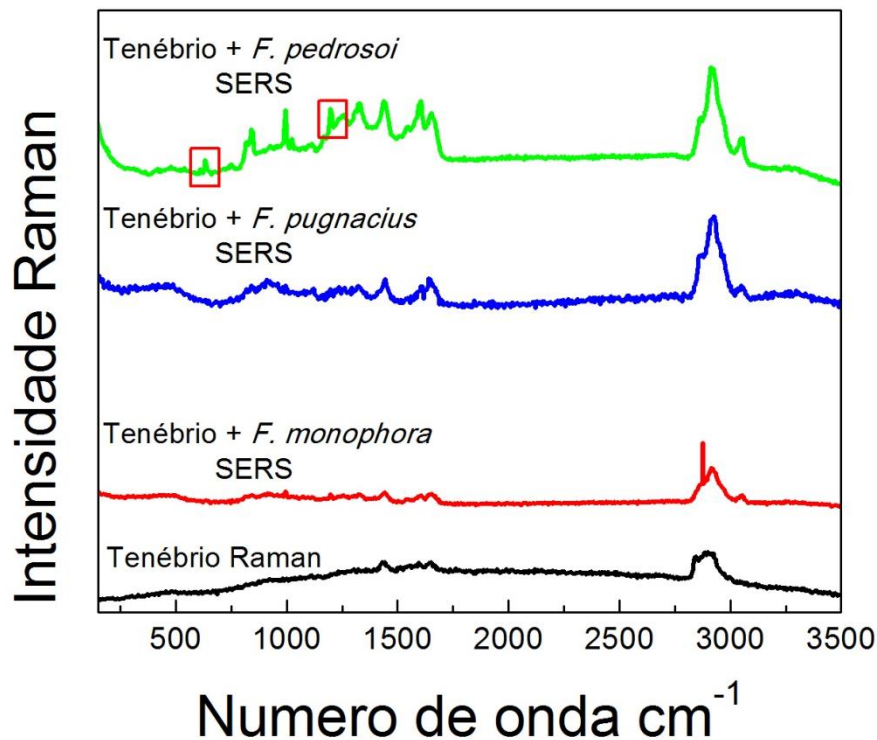
Figura 46 - Espectro Raman e SERS de cinco espécies distintas de *Candidas*



Fonte: A autora (2019)

Outro resultado preliminar, mas promissor, foi a diferença espectral na análise da hemocele dos tenébrios que foram inoculados contaminados com algumas espécies de *Fonsecaea*, os resultados são evidenciados na próxima figura (Figura 47).

Figura 47 - Resultado SERS para amostras de hemocele de tenébrios.



Fonte: A autora (2019).

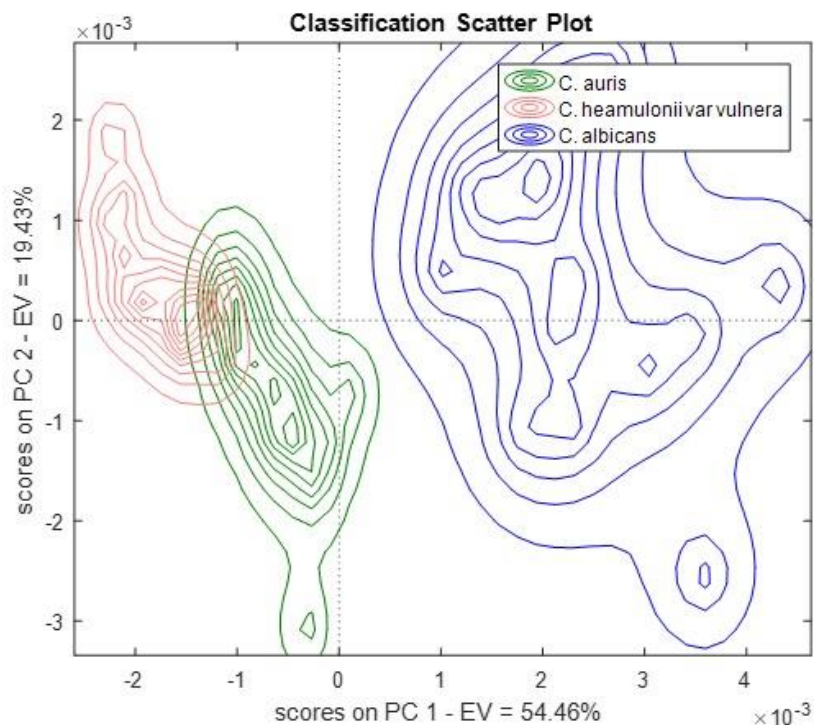
Portanto, os resultados *in vitro* obtidos são promissores, haja vista a descoberta de diferentes regiões de amplificações das moléculas que constituem a parede fúngica. Estas análises são os passos iniciais para a construção de bibliotecas SERS para a identificação e diferenciação desses microrganismos.

Para concluir esta apresentação de resultados, destaca-se que foi possível verificar distinções espectrais de gêneros. Para isso, foi necessário primeiro compreender a diferença entre quantificação e classificação. Como definido por Góes (2018), no caso de uma atividade de quantificação busca-se determinar experimentalmente quantidades e incertezas respondendo à pergunta “quanto há” em uma amostra, já no caso de classificação deseja-se responder à pergunta “o que é” a amostra.



Para a distinção de espécies, conjuntos de dados como os da Figura 46 podem ser analisados utilizando uma técnica conhecida como PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*. O PCA é uma das técnicas utilizadas com intuito de classificar amostras. Os resultados são preliminares, mas apresentamos na Figura 48 a análise realizada com auxílio do Prof. Dr. Rafael Eleodoro de Góes, da UTFPR. As regiões coloridas indicam a “separabilidade” dos dados, o que evidencia que existe informação nos espectros SERS com potencial de ser utilizada para a diferenciação destes fungos.

Figura 48 - Resultado PCA para distinção de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*.



Fonte: A autora (2019)

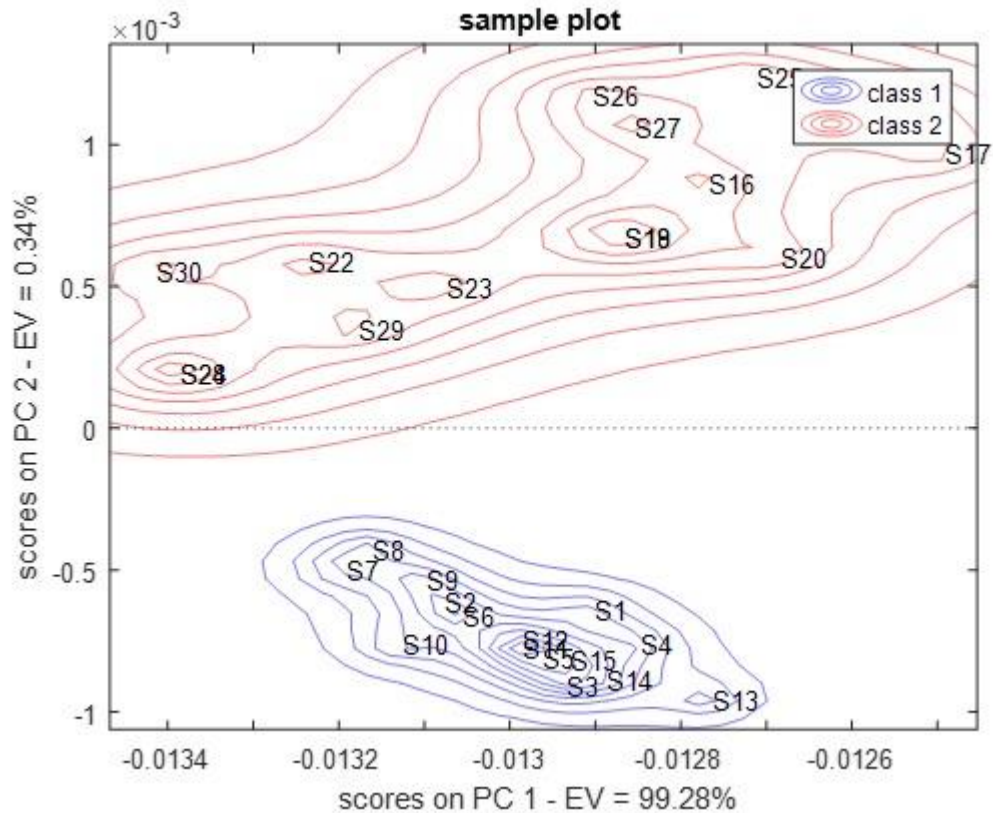
A Figura 48 é ilustrativa da possibilidade da diferenciação por SERS, via PCA, de alguns dos fungos com maior incidência clínica no Brasil (COLOMBO, 2013). O desenvolvimento do protocolo para coleta de dados no microscópio Raman, incluindo a padronização do sistema de cultivo, crescimento e coleta das amostras fúngicas



isoladas da clínica e do ambiente e os procedimentos de medidas e tratamento de dados estão ainda em fase de elaboração.

Recentemente, com auxílio de pesquisadores do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, foi possível ter acesso a amostras de uma cepa de *Candida auris* para análise. Os espectros SERS desse fungo foram obtidos e, por meio de análise estatística tipo PCA, produziu-se um mapa inicial que aponta a possibilidade de distinguir a *C. auris* da *C. albicans*, conforme pode ser verificado na Figura 49.

Figura 49 - Resultado preliminar de PCA para distinção de *Candida albicans* e *Candida auris*.



Fonte: A autora (2019)

Na Figura 49, as regiões representadas por cores diferentes evidenciam a possibilidade de distinção, via SERS, das espécies.

A propósito da *C. auris*, o jornal *The New York Times* publicou, em 2019, a notícia de que este fungo desenvolveu habilidade não somente de resistir aos

antifúngicos tradicionais, como também de sobreviver ao ambiente hospitalar, o que o torna um grande problema de saúde pública. Portanto, distinguir esta espécie de outras cândidas constitui um trabalho científico relevante.

## 5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foi demonstrado que as nanopartículas de Ni, Co e Bi sintetizadas por meio de ablação a laser em água possuem propriedades plasmônicas (ressonâncias de plásmons de superfície – SPR) e, portanto, podem ser usadas para a criação de campos eletromagnéticos locais intensos (efeito de aumento plasmônico), que é a base do efeito SERS.

As nanopartículas foram caracterizadas por meio de múltiplas técnicas e foram utilizadas para a produção de filmes em superfícies de vidro e de silício. Estes filmes, quando as nanopartículas foram depositadas na presença de campo magnético, resultaram em substratos com potencial de aplicação em experimentos SERS. Esta técnica de deposição de nanopartículas assistida por ímã é uma técnica eficaz para produzir filmes homogêneos, com distribuição de *hot spots* em toda a área de deposição.

Tanto os coloides quanto os substratos foram utilizados para a detecção, via espectroscopia Raman, de algumas moléculas biológicas de interesse, a saber: dois aminoácidos, prolina e glicina, e ureia. Essas moléculas serviram de analitos para a demonstração do potencial de uso das nanopartículas de Ni, Co e Bi na detecção baseada em SERS. Para isso, foram empregados dois procedimentos experimentais distintos: “gota-gota” e “gota-substrato”. Ambos os procedimentos implicaram em fatores de aumento entre  $10^{10}$  e  $10^{11}$ , o que indica a possibilidade de utilizar estas nanopartículas “não convencionais” em experimentos e sensores SERS, dado que a amplificação de sinal é comparável com aquela associada ao uso de nanopartículas de ouro. O uso da metodologia “gota-gota” ou “gota-substrato” depende das condições experimentais específicas e implica em técnicas relativamente simples para interrogação de analitos. Esta versatilidade tem potencial de ser empregada no desenvolvimento de biossensores.

De fato, os substratos baseados em nanopartículas de Ni, Co e Bi permitem a detecção de concentrações muito pequenas (em escala de  $\mu\text{M}$ ) de prolina, glicina e ureia. Alguns de nossos resultados recentes sugerem mesmo a possibilidade de

detecção de uma molécula única usando nossas nanopartículas e nossos substratos SERS, tema que está em desenvolvimento no laboratório Fotonanobio.

Dentre as nanopartículas estudadas, cabe destacar uma característica interessante das nanopartículas de cobalto: o pico Raman em torno de  $680\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser utilizado como referência interna em experimentos de espectroscopia vibracional. Além disso, demonstrou-se neste trabalho que as nanopartículas de cobalto, ao serem depositadas sobre superfícies contendo células de fungos, alojam-se na superfície das células, particularmente a região da parede. Este resultado indica que, nos experimentos, o sinal SERS obtido deve estar relacionado a estruturas presentes na parede, o que constitui importante contribuição aos processos de uso da técnica para identificação e diferenciação de fungos (gênero e espécie).

Outro aspecto inovador do trabalho foi à demonstração de que é possível utilizar as nanopartículas sintetizadas na detecção de fungos, contudo, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos de preparação de amostras, bem como a realização de medidas de espectros em quantidade necessária para dar suporte à análise estatística (do tipo PCA ou congêneres). Nossos resultados preliminares indicam fortemente a separabilidade de fungos por meio da técnica de interrogação ótica proposta, o que abriu caminho para o desenvolvimento de novos e promissores trabalhos.

Acreditamos que os desenvolvimentos relatados nesta dissertação contribuirão para expandir a aplicação do efeito SERS em sensores, com ênfase em biomedicina e diagnóstico molecular.

### 5.1. Trabalhos Futuros

Foram muitos os desdobramentos desse estudo, um deles é o aperfeiçoamento dos substratos para os analito líquidos, pois apesar de comprovada a homogeneidade e eficiência dos substratos ainda há uma concentração significativa de analito que se aglomera nas bordas da gota quando a amostra é líquida.

Outro estudo que já está em andamento é o protocolo específico para determinação da molécula específica que é distinta em cada espécie de fungo, assim como a relação desse espectro com o cultivo, preparo e tempo de crescimento para cada espécie e gênero abordados aqui. Além disso, a extensão dessas análises não apenas para fungos da classe clínica, mas também ambiental, como é o caso das *Fonsecaeas* que abrangem tanto doenças e problemas clínicos quanto ambientais de acordo com a espécie estão em andamento.

Outro projeto em paralelo que surgiu desses estudos foi à necessidade de avaliar a possibilidade de monitoramento de diagnóstico para esses microrganismos via SERS e outros métodos espectroscópicos como uma alternativa para os atuais que possuem um custo muito alto.

## REFERÊNCIAS

- AMENDOLA, Vincenzo *et al.* Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. **Journal Of Physics: Condensed Matter**, [s.l.], v. 29, n. 20, p.1-48, 20 abr. 2017. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1361-648x/aa60f3>.
- AMENDOLA, Vincenzo; MENEGHETTI, Moreno. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 11, n. 20, p.3805-3821, 2009. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b900654k>.
- AMENDOLA, Vincenzo; MENEGHETTI, Moreno. What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? **Phys. Chem. Chem. Phys.**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.3027-3046, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2cp42895d>.
- ANTINORI, Spinello *et al.* Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **European journal of internal medicine**, v. 34, p. 21-28, 2016.
- AUSANIO, G *et al.* Morphology, structure and magnetic properties of (Tb<sub>0.3</sub>Dy<sub>0.7</sub>Fe<sub>2</sub>)<sub>100-x</sub>Fex nanogranular films produced by ultrashort pulsed laser deposition. **Nanotechnology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.536-542, 21 dez. 2005. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/17/2/033>.
- BAIA M., ASTILEAN S., ILIESCU T.; RAMAN AND SERS INVESTIGATIONS OF PHARMACEUTICALS Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2008, xiv, 214 pp. 81 illus., ISBN: 978-3-540-78282-7
- BARCIKOWSKI, S. *et al.* **Handbook of Laser Synthesis of Colloids**. S.i: S.i, 2016. p. 150.
- BECKER, J.; **Plasmons as Sensors**, Springer Theses, p. 91. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012. DOI: 10.1007/978-3-642-31241-0\_8.
- BEZERRA, A. G. *et al.* Plasmonics and SERS activity of post-transition metal nanoparticles. **Journal Of Nanoparticle Research**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.1-13, maio 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-018-4249-8>.
- BEZERRA, A. G. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering using bismuth nanoparticles: a study with amino acids. **Journal Of Nanoparticle Research**, [s.l.], v. 19, n. 11, p.1-7, nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-017-4057-6>.
- BODEY, Gerald P. *et al.* The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **The American journal of medicine**, v. 112, n. 5, p. 380-385, 2002.
- BORA, Tanujjal. Recent Developments on Metal Nanoparticles for SERS Applications. Noble and Precious Metals-Properties, **Nanoscale Effects and Applications**, 2018.

BOUTONNET, Magali *et al.* The preparation of monodisperse colloidal metal particles from microemulsions. **Colloids And Surfaces**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.209-225, nov. 1982. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6622\(82\)80079-6](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6622(82)80079-6).

CABELLO, Gema *et al.* Cu@Au self-assembled nanoparticles as SERS-active substrates for (bio)molecular sensing. **Journal Of Alloys And Compounds**, [s.l.], p.1-24, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.03.279>.

CHAMUAH, Nabadweep *et al.* SERS on paper: an extremely low cost technique to measure Raman signal. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 48, p. 485601, 2017.

CHATTAWAY, F. W.; HOLMES, Mary R.; BARLOW, A. J. E. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 367-376, 1968.

CHU, Benjamin. **Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice**. 2. ed. Mineola: Dover Publications, Inc., 2007. 343 p.

COLOMBO, A. L. *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.17, n.3, p.283-312, 2013.

CREIGHTON, J. A.; EADON D. G., “Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements”, **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, vol. 87(24), pp. 3881-3891, 1991.

DAHL, Jennifer A.; MADDUX, Bettye L. S.; HUTCHISON, James E.. Toward Greener Nanosynthesis. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 107, n. 6, p.2228-2269, jun. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr050943k>.

DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. **MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA Aplicações e preparação de amostras Aplicações e preparação de amostras: Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: Edipucrs, 2007.

FAN, Meikun; ANDRADE, Gustavo FS; BROLO, Alexandre G. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. **Analytica chimica acta**, v. 693, n. 1-2, p. 7-25, 2011.

FARIA, D. L. A. de; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S.. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman. **Química Nova**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.319-323, jun. 1997. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421997000300014>.

FRANCISCATO, Douglas S. *et al.* Thiosemicarbazone@Gold nanoparticle hybrid as selective SERS substrate for Hg 2+ ions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 204, p.174-179, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2018.06.038>.

GHOSH, Pallab. **Colloidal Materials: Part III**. Disponível em: <<https://nptel.ac.in/courses/103103033/module1/lecture4.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2019.

GÓES, Rafael Eleodoro. **DETECÇÃO DE GLIFOSATO EM ÁGUA POR RECONHECIMENTO DE PADRÕES EM ESPECTROSCOPIA ASSISTIDA POR NANOPARTÍCULAS DE PRATA FABRICADAS POR ABLAÇÃO A LASER**. 2018. 157 f. Tese (Doutorado) - Programa De Pós-Graduação Em Engenharia Elétrica E Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

GOLDSTEIN, Joseph I. *et al.* **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis**. 3. ed. S.i: Springer Science+business Media, 2003.

HAISS, Wolfgang *et al.* Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 79, n. 11, p.4215-4221, jun. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac0702084>.

HERRERA, Gloria M.; PADILLA, Amira C.; HERNANDEZ-RIVERA, Samuel P. Surface enhanced Raman scattering (SERS) studies of gold and silver nanoparticles prepared by laser ablation. **Nanomaterials**, v. 3, n. 1, p. 158-172, 2013.

HUANG, Zhicheng *et al.* Nanomaterial-based SERS sensing technology for biomedical application. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 24, p. 3755-3774, 2019.

IRAVANI, Siavash. Methods for preparation of Metal Nanoparticles. In: THOTA, Sreekanth; CRANS, Debbie C.. **Metal Nanoparticles: Synthesis and Applications in Pharmaceutical Sciences**. S.i.: John Wiley & Sons, 2018. p. 15-31.

JOHNSON Junior, Charles S.; DON, Gabriel A.. **Laser Light Scattering**. Nova Iorque: Dover Publications, Inc., 1994. 96 p.

JONES, D. G. R. *et al.* Hydrogen Absorption Studies on Tb<sub>0.27</sub>Dy<sub>0.73</sub>Fe<sub>1.9</sub>. **Journal Of The Less-common Metals**, S.i., v. 158, n. , p.153-162, 1990.

KAUSHIK, Ajeet. Biomedical nanotechnology related grand challenges and perspectives. **Frontiers in Nanotechnology**, v. 1, p. 1, 2019.

KELLY, K. Lance *et al.* The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 107, n. 3, p.668-677, jan. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp026731y>.

KUMAR, Santosh *et al.* Vibrational spectrum of glycine molecule. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 61, n. 11-12, p.2741-2746, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2004.09.029>.

LANGER, Judith *et al.* Present and future of surface-enhanced Raman scattering. **ACS nano**, 2019.



LANGER, Judith; NOVIKOV, Sergey M; LIZ-MARZÁN, Luis M. Sensing using plasmonic nanostructures and nanoparticles. **Nanotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 32, p.1-28, 24 jul. 2015. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/26/32/322001>.

LAZAROTTO, Marília. **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium spp.* E *Pestalotiopsis spp.* ASSOCIADOS A *Carya illinoensis* NO RIO GRANDE DO SUL**. 2013. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

LEE P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **J. Phys. Chem.**, 86, 17, p.3391–3395, ago. 1982  
<https://doi.org/10.1021/j100214a025>

LEORDEAN, C.; CANPEAN, V.; ASTILEAN, S.. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Analysis of Urea Trace in Urine, Fingerprint, and Tear Samples. **Spectroscopy Letters**, [s.l.], v. 45, n. 8, p.550-555, out. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00387010.2011.649439>.

LINDSAY, Stuart. **Introduction to nanoscience**. Oxford University Press, 2010.

LINK, Stephan; EL-SAYED, Mostafa A.. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 103, n. 40, p.8410-8426, out. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp9917648>.

LISJAK, Darja; MERTELJ, Alenka. Anisotropic magnetic nanoparticles: A review of their properties, syntheses and potential applications. **Progress In Materials Science**, [s.l.], v. 95, p.286-328, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.03.003>.

MAIER, Stefan Alexander. **Plasmonics: Fundamentals and Applications**. Bath: Springer, 2007. 223 p.

MAQUELIN, Kees et al. Rapid identification of *Candida* species by confocal Raman microspectroscopy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 594-600, 2002).

MAYERGOYZ, Isaak; ENGDAHL, Göran. **Handbook of Giant Magnetostrictive Materials**. S.i: Academic Press, 1999.

MCMAHON J. M.; SCHATZA G.; GRAY S. K., “Plasmonics in the ultraviolet with the poor metals Al, Ga, In, Sn, Tl, Pb, and Bi”, **Phys. Chem. Chem. Phys.**, vol. 15, pp. 5415–5423, 2013.

MCTIC. **Nanotecnologia** Disponível em: <  
[https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/tecnologia/tecnologias\\_convergentes/paginas/nanotecnologia/NANOTECONOLOGIA.html?searchRef=centro&tipoBusca=expressaoExat](https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/tecnologia/tecnologias_convergentes/paginas/nanotecnologia/NANOTECONOLOGIA.html?searchRef=centro&tipoBusca=expressaoExat)  
>. Acesso em: 04 mai. 2020.

MENG, Xinyu *et al.* A Graphene–Silver Nanoparticle–Silicon Sandwich SERS Chip for Quantitative Detection of Molecules and Capture, Discrimination, and Inactivation of

Bacteria. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 90, n. 9, p.5646-5653, 2 abr. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05139>.

MICHNA, Aneta *et al.* Monolayers of silver nanoparticles obtained by green synthesis on macrocation modified substrates. **Materials Chemistry And Physics**, [s.l.], v. 227, p.224-235, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.01.072>.

MOHANCHANDRA, K. P. *et al.* Sputter deposited Terfenol-D thin films for multiferroic applications. **Aip Advances**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.1-11, set. 2015. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4930602>.

MOOS, Rafaela *et al.* Influence of plasmon coupling on the photoluminescence of ZnS/Ag nanoparticles obtained by laser irradiation in liquid. **Optical Materials**, [s.l.], v. 72, p.98-105, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.optmat.2017.05.050>.

MOSIER-BOSS, Pamela A. Review of SERS substrates for chemical sensing. **Nanomaterials**, v. 7, n. 6, p. 142, 2017.

MOSKOVITS M., Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective, v.36., Issue6-7 Special Issue: Surface enhanced raman spectroscopy June - July 2005 p. 485-496

MURO, Marisol Dominguez. **ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Candida spp DETECTADAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM SUSPEITA DE SEPTICEMIA.**2012. 128 f. Tese (Doutorado) - Programa De Biotecnologia Aplicada À Saúde Da Criança E Do Adolescente Análise, Instituto Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, 2012.

MURTY, Budaraju S. *et al.* **Textbook of nanoscience and nanotechnology.** Springer Science & Business Media, 2013.

NADAS, Rafael B. *et al.* Synthesis and Optical Characterization of Terfenol-D Nanoparticles. **2018 Sbfoton International Optics And Photonics Conference (sbfoton iopc)**, [s.l.], p.1-4, out. 2018. IEEE. <http://dx.doi.org/10.1109/sbfoton-iopc.2018.8610885>.

NADAS, Rafael Battistella *et al.* **Produção e caracterização de nanopartículas de Terfenol-D.** 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

NANOSCIENCE Instruments, **Optical Profilometry.** On-line, Curitiba, 12 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.nanoscience.com/techniques/optical-profilometry/>>. Acesso em: 12 fev. 2020.

NARWAL, Vinay; PUNDIR, C.s.. Development of glycerol biosensor based on co-immobilization of enzyme nanoparticles onto graphene oxide nanoparticles decorated pencil graphite electrode. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 127, p.57-65, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.253>.

NIST. Disponível em: <<https://www.nist.gov/programs-projects/nano-biophotonics-molecular-imaging>> . Acesso em: 20 abr. 2020.

NOOTHALAPATI, H., *et al.* Label-free Chemical Imaging of Fungal Spore Walls by Raman Microscopy and Multivariate Curve Resolution Analysis. **Science Reports** 6, 27789 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep27789>

PANG, Shintaro; YANG, Tianxi; HE, Lili. Review of surface enhanced Raman spectroscopic (SERS) detection of synthetic chemical pesticides. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 85, p.73-82, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.017>.

PARMELAND, L. *et al.* Candida albicans and non-Candida albicans fungemia in an institutional hospital during a decade. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 33–7, 2013.

PLAUTZ, G. L. *et al.* Evolution of size distribution, optical properties, and structure of Si nanoparticles obtained by laser-assisted fragmentation. **Applied Physics A**, [s.l.], v. 123, n. 5, p.1-9, 19 abr. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00339-017-0961-y>.

PLAUTZ, Gabriela Luchtenberg. **Caracterização Óptica e Estrutural de Pontos Quânticos de Silício Obtidos por Ablação a Laser em Água**. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Cap. 2.

PRASAD, Paras N. **Introduction to biophotonics**. John Wiley & Sons, 2004b.

PRASAD, Paras N. **Nanophotonics**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2004a.

REUS, Thamile Luciane *et al.* Dose-dependent cytotoxicity of bismuth nanoparticles produced by LAL in a reference mammalian cell line BALB/c 3T3. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 53, p.99-106, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.003>.

RODRIGUES, Luiza Souza. **SEQUENCIAMENTO E COMPARAÇÃO DO GENOMA DE Candida haemulonii var. vulnera ISOLADAS DE HEMOCULTURAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS**. 2019. 119 f. Tese (Doutorado) - Programa De Biotecnologia Aplicada À Saúde Da Criança E Do Adolescente Análise, Instituto Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, 2012.

ROSA, Ramon Gabriel Teixeira. **Caracterização de nanopartículas de Bi produzidas por ablação a laser**. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ROUESSAC, Francis; ROUESSAC, Annick. **Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques**. S.i: Wiley, 2007.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SAKHO, El Hadji Mamour *et al.* Dynamic Light Scattering (DLS). In: THOMAS, Sabu *et al.* (Ed.). **Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization**. S.i.: Elsevier, 2017. Cap. 2. p. 37-49.

SALATA, Oleg V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p. 3, 2004.

SCHRADER, Bernhard (Ed.). **Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications**. S.i: Weinheim, 1995.

SCHULLER, Jon A. *et al.* Plasmonics for extreme light concentration and manipulation. **Nature Materials**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.193-204, 19 fev. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2630>.

SHANG, Yingxu *et al.* A bumpy gold nanostructure exhibiting DNA-engineered stimuli-responsive SERS signals. **Nanoscale**, [s.l.], v. 10, n. 20, p.9455-9459, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8nr00986d>.

SHAO, Bo *et al.* Coupling of Ag Nanoparticle with Inverse Opal Photonic Crystals as a Novel Strategy for Upconversion Emission Enhancement of NaYF<sub>4</sub>: Yb<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup> Nanoparticles. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 7, n. 45, p.25211-25218, 3 nov. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.5b06817>.

SMITH, Ewen; DENT, Geoffrey. **Modern Raman spectroscopy: a practical approach**. John Wiley & Sons, 2019.

TANGRA, Ankush Kumar *et al.* Investigation of structural, Raman and photoluminescence properties of novel material: KFeO<sub>2</sub> nanoparticles. **Journal Of Alloys And Compounds**, [s.l.], v. 778, p.47-52, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.11.059>.

THALER, Juliana *et al.* SERS activity of Co, Ni and Bi nanoparticles. **2018 Sbfoton International Optics And Photonics Conference (sbfoton iopc)**, [s.l.], p.1-4, out. 2018. IEEE. <http://dx.doi.org/10.1109/sbfoton-iopc.2018.8610936>.

THORNTON, Stephen T.; REX Andrew. **Modern Physics for Scientists and Engineers**, Fourth Edition, 2013.

VAN ECK, Martin. **QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE UREA SYNTHESIS BY MEANS OF LASER RAMAN SPECTROMETRY**. 1985. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Technische Universiteit Delft, Delft, 1985.

VICENTE, V. A.; NAJAFZADEH, M. J.; Sun, J.; HOOG, G. S. de. Molecular ecology of *Fonsecaea* sibling species isolated from endemic area of chromoblastomycosis in Brazil. **Fungal Diversity**, 2013.

VICENTE, V. A.; ORÉLIS-RIBEIRO, R.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; GUERRA, R. S.; MIESCH, S.; OSTRENSKY, A.; MEIS, J. F.; KLASSEN, C. H.; HOOG, G. S. De; BOEGER, W. A. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangroveland crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**, 2012.

VICENTE, V.A., WEISS, V.A., BOMBASSARO, A., MORENO, L.F., COSTA, F.F., RAITTZ, R.T. et al. (2017). Comparative genomics of sibling species of *Fonsecaea* associated with human chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**. 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01924.

WALTON, Alan G.; RIPPON, W. B.; KOENIG, Jack L.. Raman spectroscopy of proline oligomers and poly-L-proline. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 92, n. 25, p.7455-7459, dez. 1970. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja00728a034>.

WANG, Chen *et al.* Molecular cage-bridged plasmonic structures with well-defined nanogaps as well as the capability of reversible and selective guest trapping. **Chemical Science**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.889-895, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7sc03536e>.

WANG, Deqiang; JIANG, Weifeng. Preparation of chitosan-based nanoparticles for enzyme immobilization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 126, p.1125-1132, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.243>.

WIKIPEDIA. **Glicina**. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Glicina>>. Acesso em: 31 out. 2018.

WIKIPEDIA. **Prolina**. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Prolina>>. Acesso em: 31 out. 2018.

WIKIPEDIA. **Ureia**. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Ureia>>. Acesso em: 31 out. 2018.

WILLIAMS, David B.; CARTER, C. Barry. Transmission Electron Microscopy: **A Textbook for Materials Science**. S.i: Springer Science&business Media, 2009.

XAVIER, Hamilton Santos. **Análise por perfilometria e tomografia de coerência óptica da rugosidade superficial e do desgaste do esmalte bovino microabrasionado**. 2011. 124 folhas. Dissertação. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

YAN, Zijie; CHRISEY, Douglas B.. Pulsed laser ablation in liquid for micro-/nanostructure generation. **Journal Of Photochemistry And Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.204-223, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.04.004>.

YURENYA, A. *et al.* Synthesis and Mössbauer study of <sup>57</sup>Fe-based nanoparticles biodegradation in living cells. **Journal Of Magnetism And Magnetic Materials**, [s.l.], v. 474, p.337-342, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.11.040>.

ZENG, Haibo *et al.* Nanomaterials via laser ablation/irradiation in liquid: a review. **Advanced Functional Materials**, v. 22, n. 7, p. 1333-1353, 2012.

ZHANG J.; LAN C. Q., "Nickel and cobalt nanoparticles produced by laser ablation of solids in organic solution", **Materials Letters**, vol. 62, pp. 1521–1524, 2008.

ZHANG, Dongshi; GÖKCE, Bilal; BARCIKOWSKI, Stephan. Laser Synthesis and Processing of Colloids: Fundamentals and Applications. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 117, n. 5, p.3990-4103, 13 fev. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00468>.

## ANEXOS

### Publicações

#### Trabalhos apresentados em congresso

#### COMPLETOS:

1. MACHADO, THIAGO N.; NADAS, RAFAEL B.; THALER, JULIANA; FEITOSA, LUCAS F. ; DE GOES, RAFAEL E. ; KAMIKAWACHI, RICARDO C. ; LENZ, JORGE A. ; SCHREINER, WIDO H. ; BEZERRA, ARANDI G. . Plasmonics and SERS activity: beyond gold and silver. In: 2019 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2019, Sao Paulo. 2019 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2019. p. 1.

2. THALER, JULIANA ; MACHADO, THIAGO N. ; NADAS, RAFAEL ; LENZ, JORGE A. ; KAMIKAWACHI, RICARDO C. ; SCHREINER, WIDO H. ; BEZERRA, ARANDI G. ; WOISKI, THIAGO D. . SERS activity of Co, Ni and Bi nanoparticles. In: 2018 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2018, Campinas. 2018 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2018. p. 1.

#### RESUMOS

1. J. Thaler ; T. N. Machado ; R. B. Nadas ; J. A. Lenz ; R. E. de Góes ; R. C. Kamikawachi ; W. H. Schreiner ; A. G. Bezerra-Jr . Highly sensitive and uniform SERS hotspots based on Co, Ni, and Bi nanoparticles. In: Encontro de Outono da SBF 2019, 2019, Aracaju. Anais EOSBF2019, 2019.

2. L. F. Feitosa ; L. B. Schneider ; T. N. Machado ; R. B. Nadas ; J. Thaler ; R. C. Barreto ; R. E. de Góes ; J. A. Lenz ; W. H. Schreiner ; A. G. Bezerra-Jr . Surface-enhanced Raman scattering (SERS) analysis of urea using several materials nanoparticles. In: Encontro de Outono da SBF 2019, 2019, Aracaju. Anais EOSBF2019, 2019.

3. V. A. Vicente ; G. Muniz ; S. Luders ; A. Bombassaro ; B. Jacomel ; J. Soares ; G. Zuzarte ; R. R. Gomes ; E. Silveira ; J. Thaler ; R. O. dos Santos ; T. N. Machado ; R. E. de Góes ; A. G. Bezerra-Jr . Fungi identification by Surface Enhanced Raman Spectroscopy. In: Encontro de Outono da SBF 2019, 2019, Aracaju. Anais EOSBF2019, 2019.

4.L. Foti ; J. Kasuko ; T. D. Woiski ; L. M. Dalla Costa ; W. H. Schreiner ; C. G. P. S. Marangoni ; T. N. Machado ; R. B. Nadas ; J. Thaler ; J. A. Lenz ; R. E. de Góes ; R. C. Kamikawachi ; A. G. Bezerra-Jr . Antibiotics detection using surface-enhanced Raman scattering. In: Encontro de Outono da SBF 2019, 2019, Aracaju. Anais EOSBF2019, 2019.

5. Thiago N. Machado; Rafael Nadas; Juliana Thaler ; Rafael E. de Goes ; Ricardo C. Kamikawachi ; Jorge A. Lenz ; Leonardo Foti ; Wido H. Schreiner ; Arandi G. Bezerra Jr . Plasmonics and SERS activity of metal nanoparticles: Beyond gold and silver. In: European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules 2019, 2019, Dublin. Book of Abstracts, 2019.

6.Juliana Thaler ; Thiago Neves Machado ; Arandi Ginane Bezerra Jr ; Rafael Eleodoro de Goes ; Raquel de Oliveira dos Santos ; Giovanna Zuzarte ; Sofia Luders ; Jade Soares ; Bruna Jacomel ; Renata Gomes ; Amanda Bombassaro ; Vânia Aparecida Vicente ; Graciela Ines Bolzon Muñiz ; Edilson Sergio Silveira ; Edvaldo Trindade . Fungi identification by SERS using non-conventional metal nanoparticles. In: XVIII Brazilian MRS meeting, 2019, Balneário Camboriú. Anais SBPMat 2019, 2019.

### **Trabalhos a serem submetidos para revista**

Títulos provisórios:

1. SERS effect using magnetic Nanoparticles.
2. Identification of drug resistant *Candida auris* with Surface Enhanced Raman Scattering



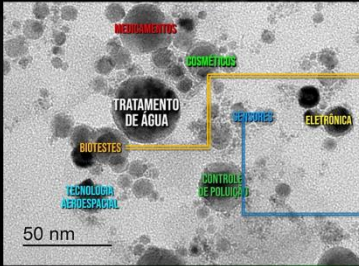

## SLIDES DA APRESENTAÇÃO DA DEFESA




**ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE COM NANOPARTÍCULAS DE Ni, Co E Bi PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E MICRORGANISMOS**

Juliana Thaler  
Orientador: Prof. Arandi G. Bezerra Jr.  
Co-orientador: Prof. Wido H. Schreiner

### Introdução

Fonte: Paula Tostes (2020)



Fonte: UniSaúde (2020)

1

### Introdução - Fungos

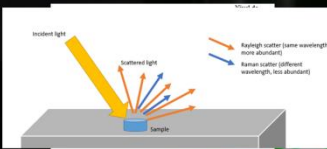



*Candida auris* colonies on agar (picture from *Centers for Disease Control and Prevention*)

2

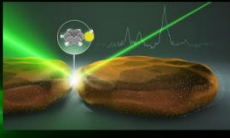
### Introdução

Raman



Fonte: Bora (2018)

SERS

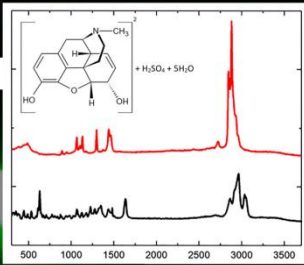


3

### Introdução

Plasmonics and SERS activity of post-transition metal nanoparticles

SERS da morfina com nanopartículas de Pb



J Nanopart Res (2018) 20:142  
<https://doi.org/10.1007/s11051-018-4249-8>

4

### Objetivo geral

Produzir nanopartículas de Ni, Co e Bi para a obtenção de efeito SERS visando à detecção de moléculas de interesse biológico e à detecção e diferenciação de microrganismos (fungos);

5

### Objetivos específicos

1. Produzir e caracterizar nanopartículas de Ni, Co e Bi;
2. Produzir substratos SERS com as nanopartículas;
3. Utilizar os colóides e substratos em experimentos SERS para a detecção de prolina, glicina e ureia;
4. Utilizar os colóides e substratos em experimentos SERS para a detecção e diferenciação de fungos;
5. Comparar os resultados dos experimentos SERS utilizando nanopartículas de Ni, Co e Bi com aqueles obtidos utilizando nanopartículas de metais nobres;
6. Comparar os resultados SERS obtidos por meio dos substratos com os obtidos por meio dos colóides (técnica gota/gota).

6

### Ablação a Laser em Líquidos (LAL)



Processo de ablação para produção de CoNP



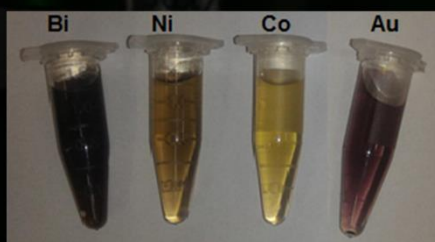
Parâmetros do equipamento  
Modelo: Nd:YAG@1064nm  
Frequência: 1.6kHz  
Energia: 3mJ, 200ms  
Tempo de ablação: 5 minutos;

Fonte: Amendola, V., Meneghetti (2009)

Fonte: A autora (2020)

7

## Ablação a Laser em Líquidos (LAL)

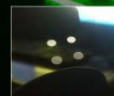


Fonte: A autora (2020)

8

## Técnicas de caracterização

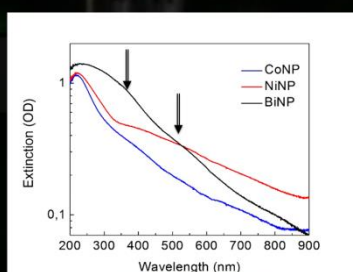
- UV-Vis;
- DLS;
- Perfilometria;
- AFM;
- SEM e EDS;
- TEM.



Fonte: A autora (2020)

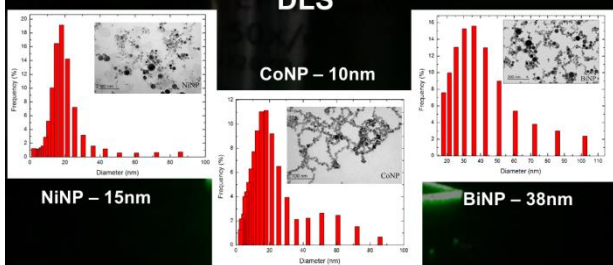
9

## UV-Vis: detecção de plásmons



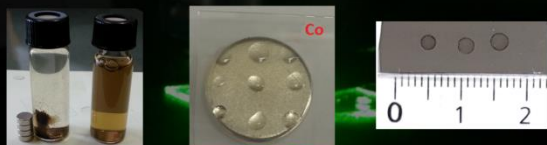
10

## DLS



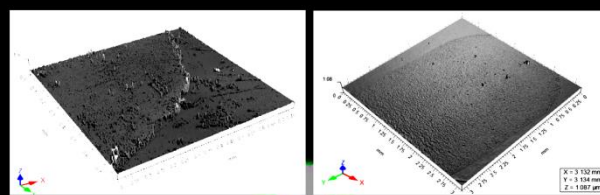
11

## Substratos



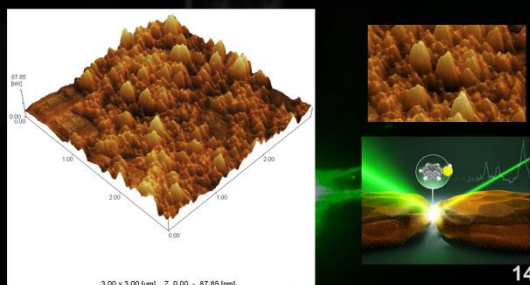
12

## Perfilometria NiNP



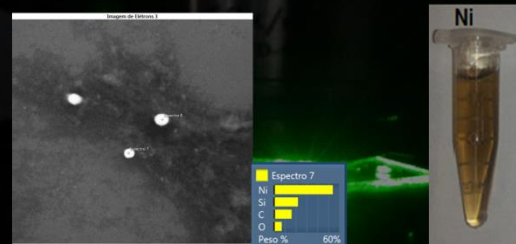
13

## AFM NiNP

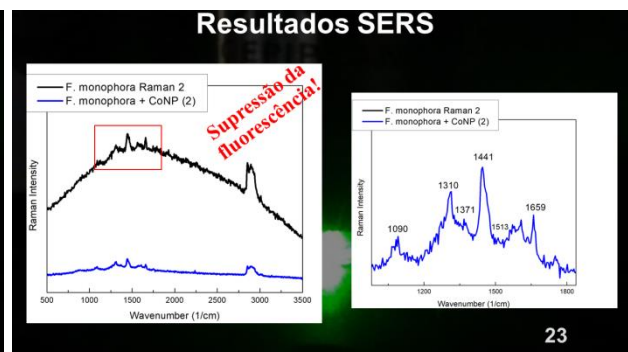
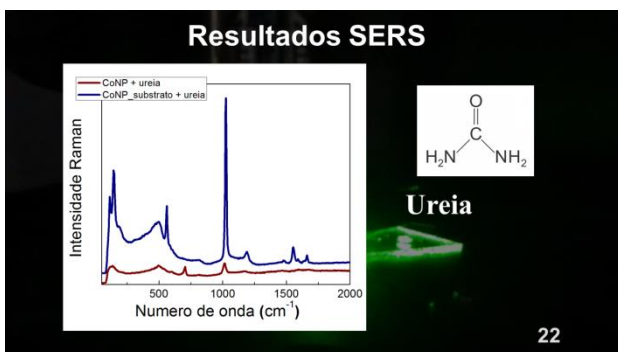
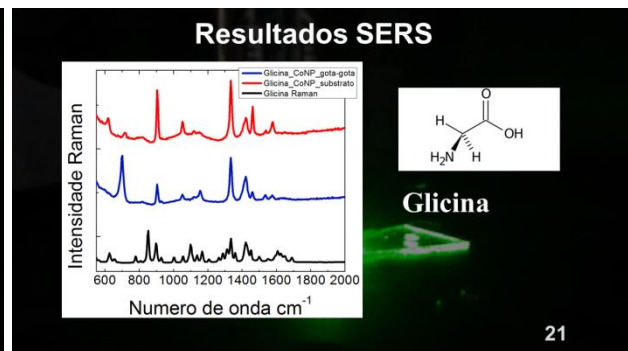
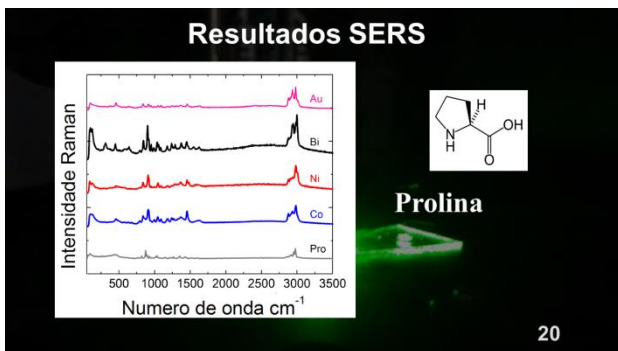
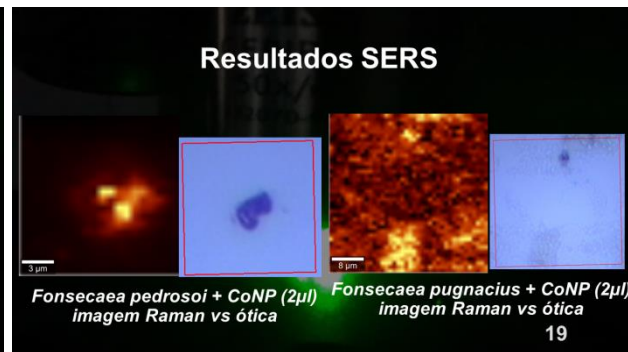
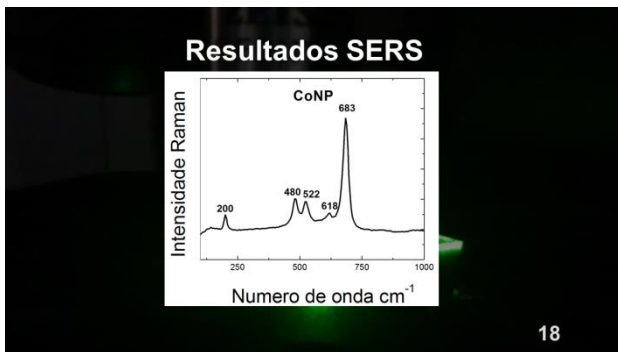
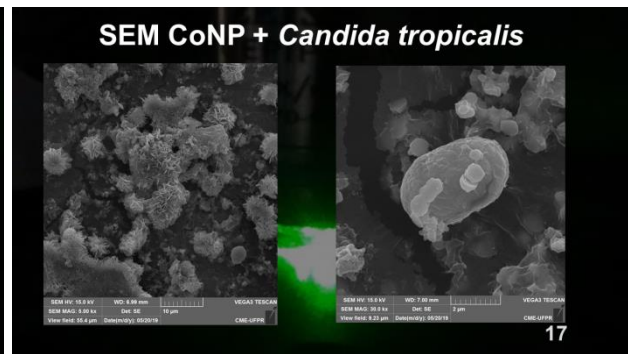
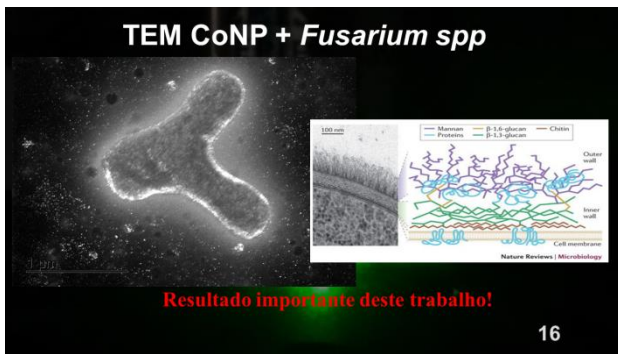


14

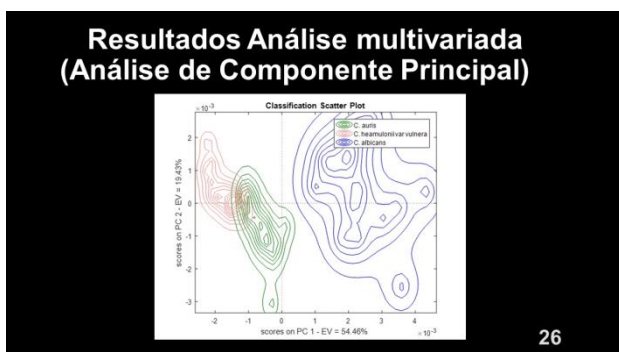
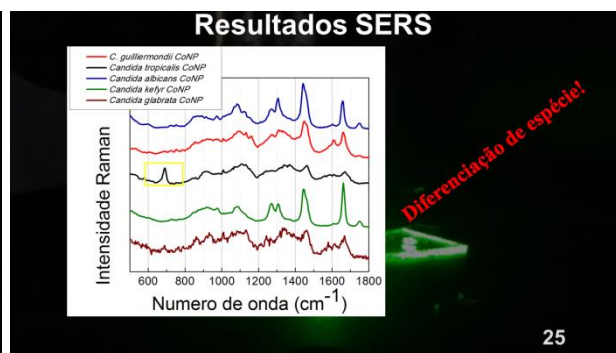
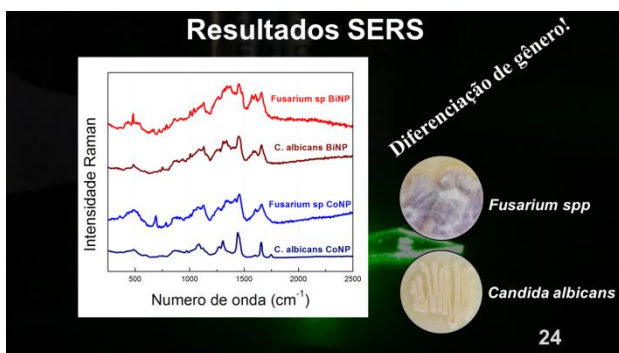
## SEM e EDS



15







- ### Principais contribuições
1. Produzimos e caracterizamos nanopartículas de Ni, Co e Bi;
  2. Produzimos substratos SERS homogêneos com as nanopartículas;
  3. Comprovamos o efeito SERS para a detecção de prolina, glicina e ureia (o efeito SERS com Ni, Co e Bi é comparável ao Au);
  4. Demonstramos a possibilidade da detecção e diferenciação de fungos via SERS (...Trabalhos futuros).
- 27

