UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

CINTIA REGINA PETRONI

**Síntese e funcionalização de nanopartículas
de ouro utilizando um modelo de substância
húmica comercial**

Versão corrigida da Dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
01/03/2013

CINTIA REGINA PETRONI

**Síntese e funcionalização de nanopartículas
de ouro utilizando um modelo de substância
húmica comercial**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Paola Corio

São Paulo
2013

**Ao Carlos, com muito amor.
Aos meus amados pais e irmã,
Lourdes, Antonio e Natalia.**

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho contei com o auxílio, de diferentes maneiras, de muitos, cada qual a seu modo. Por isso, registro aqui meus sinceros agradecimentos.

À Prof^a Paola Corio, pela confiança, oportunidade, pelos conhecimentos compartilhados, pelo aprendizado, pela orientação. Muito obrigada, mais uma vez.

Ao Prof. Gustavo Andrade, pela co-orientação, pela paciência, pelos conhecimentos transmitidos, pela disposição em sempre responder, da forma mais rápida e precisa possível, às minhas indagações, pela colaboração para com o desenvolvimento deste trabalho desde o início. Sua ajuda foi muito valiosa. Muito obrigada!

Ao Carlos, companheiro, cúmplice, parceiro de todos os momentos, agradeço pelo carinho, pela paciência, pelo incentivo constante.

À minha família, particularmente mãe, pai, irmã, tia Regina, avó Julieta, pelo amor incondicional. Vocês são meu porto seguro, e agradeço imensamente por isso.

Aos colegas do LEM e do GPQA, por todo o auxílio e coleguismo.

Ao Prof. Jorge Masini, pelo compartilhamento de informações, pelo esclarecimento de dúvidas.

Aos órgãos e agências de fomento: FAPESP, CAPES, CNPq, pelo apoio material.

A Universidade de São Paulo, especialmente ao Instituto de Química, pela oportunidade.

Aos professores com os quais aprendi muito ao longo desse período.

E a todos que de maneiras distintas contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Corantes orgânicos são uma importante classe de poluentes ambientais, sendo que a natureza da interação de tais espécies com ácidos húmicos determina seu comportamento e destino ambiental. Este trabalho investiga abordagens diferentes para a síntese de nanopartículas de ouro-ácido húmico (NPs Au/AH), o desempenho destas partículas como sensores para a determinação de traço de corantes orgânicos e da natureza da sua interação química com ácidos húmicos por técnicas de espectroscopia Raman intensificada por superfície (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS). As nanopartículas de ouro foram obtidas de forma direta em meio aquoso. A síntese foi realizada na presença de ácido húmico em vários valores de pH e na presença e na ausência de citrato de sódio. Nesta abordagem, o ácido húmico apresenta propósitos diferentes. Na síntese das nanopartículas, ele serve como agente redutor e para a estabilização da superfície, impedindo a coalescência das nanopartículas em meio aquoso. Considerando-se a utilização de nanopartículas como substratos SERS-ativos, o ácido húmico serve como uma fase de extração associada com a plataforma SERS, favorecendo a interação dos corantes orgânicos com as nanopartículas metálicas. Esta abordagem pode ser utilizada para aumentar a sensibilidade e seletividade da técnica SERS e evitar a interferência de outras espécies em solução. É também importante mencionar que o ácido húmico dá origem a um espectro Raman muito fraco e, portanto, não interfere de forma significativa na detecção espectroscópica das espécies de interesse. As NPs Au/AH obtidas foram caracterizadas por espectroscopia eletrônica, microscopia eletrônica de varredura e SERS, a fim de estabelecer uma correlação entre a sua morfologia, *plasmon* superficial, e seu uso potencial como substratos SERS. As NPs Au/AH foram utilizadas como substratos SERS no estudo de corantes têxteis

aniônicos e catiônicos. Os espectros Raman, nestes casos, foram atribuídos ao complexo formado pelo ácido húmico e cada uma das espécies de interesse. Os resultados obtidos revelaram uma dependência significativa entre as propriedades morfológicas e eletrônicas das NPs Au/AH com o procedimento de síntese, e também uma interação preferencial entre as nanopartículas e os corantes catiônicos. Conclui-se que as NPs Au/AH podem proporcionar uma abordagem útil para a caracterização espectroscópica de espécies relevantes para o ambiente e sua interação química com os ácidos húmicos, através do uso da espectroscopia Raman intensificada pela superfície.

Palavras chave: substâncias húmicas, espectroscopia Raman, efeito SERS, nanopartículas

ABSTRACT

Organic dyes are an important class of environmental pollutants, and the nature of the interaction of such species with humic acid strongly determines their environmental behavior and fate. This work investigates different approaches for the synthesis of humic acid-gold nanoparticles (HA-AuNP), the performance of these particles as sensors for trace determination of organic dyes and the nature of their chemical interaction with humic acids by surface-enhanced Raman scattering (SERS). The Au nanoparticles were obtained by direct fabrication in aqueous media. The synthesis was carried out in the presence of humic acid at various pH values, and in the presence and absence of sodium citrate. In this approach, humic acid serves different purposes. In the synthesis of the nanoparticles, they serve as reducing agent and for surface stabilization, preventing coalescence of the nanoparticles in aqueous media. Considering the use of the nanoparticles as SERS-active substrates, the humic acid serves as an extraction phase associated with the SERS platform, favoring the interaction of the organic dyes with the metallic nanoparticles. This approach can be used to enhance the sensitivity and selectivity of SERS technique and avoid interference from other species in solution. It is also important to mention that the humic acid gives rise to a very weak Raman spectrum, and therefore does not interfere significantly in the spectroscopic detection of the species of interest. The obtained HA-AuNPs were characterized by electronic spectroscopy, scanning electron microscopy and SERS, in order to establish a correlation between their morphology, surface plasmon, and their potential use as SERS platforms. The HA-AuNPs have been applied as SERS substrates

for anionic and cationic textile dyes. The recorded Raman spectra are, in these cases, assigned to the complex formed by the humic acid and each of the species of interest. The obtained results revealed a significant dependence on the morphological and electronic properties of the HA-AuNPs with the synthesis procedure, and also a strong interaction between the nanoparticles and cationic dyes. We conclude that HA-AuNP may provide a valuable approach for the spectroscopic characterization of environmentally relevant species and their chemical interaction with humic acids, through the use of surface enhanced Raman spectroscopy.

Keywords: humic substances, Raman spectroscopy, surface-enhanced Raman scattering, SERS, nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação da estrutura de um ácido húmico.	20
Figura 2.	Mecanismos para a formação de substâncias húmicas. Compostos nitrogenados reagem com ligninas modificadas (via 4), quinonas (vias 2 e 3) e açúcares (via 1).	21
Figura 3.	Mecanismos para espalhamento da radiação elástico (Rayleigh) e inelásticos (Stokes e Anti-Stokes).	23
Figura 4.	Representação da intensificação do campo elétrico para nanopartículas de diversas formas, representadas pela região central. (a) esfera; (b) triângulo; (c) cilindro; (d) elipsoide. As escalas à direita de cada figura indicam o valor da intensificação do campo elétrico local em relação ao campo elétrico incidente ($E_{\text{local}}/E_{\text{incidente}}$). Os valores escritos em vermelho em cada figura indicam o comprimento de onda da radiação excitante, que corresponde ao máximo de extinção das nanopartículas.	26
Figura 5.	Espectro de absorção de um filme de prata de 5 nm em vidro.	27
Figura 6.	Microscopia eletrônica de transmissão – MET (topo), espectro de absorção (à esquerda) e fotografias (à direita) de soluções aquosas de nanopartículas de ouro em diferentes tamanhos. Escala: 500 nm para a e b, 100 nm para c, d, e.	30
Figura 7.	Ilustração esquemática de formas diferentes de nanoestruturas Lista de nanopartículas e ouro e prata em várias morfologias, composições e estruturas em conjunto com suas típicas localizações de máximo de absorção na ressonância de <i>plasmon</i> de superfície na região do visível.	30
Figura 8.	Imagens MET de (a) nanopartículas de prata obtidas por redução com citrato, (b) nanopartículas de ouro obtidas por redução com borohidreto, e (c) nano-hastes de ouro, (d) nanoquadrados de ouro e seus padrões de difração. Imagens MFA de (e) filme de nanopartículas de ouro incorporadas em filme de quitosana e (f) nanofios de prata.	31
Figura 9.	Esquema representativo de uma bicamada de surfactante sobre a superfície de uma nanoestrutura metálica, mostrando três regiões que podem estar envolvidas em diferentes processos químicos.	33
Figura 10.	Fórmulas estruturais dos corantes utilizados.	36

Figura 11.	Espectros de extinção das nanopartículas de Au/AH com aquecimento em estufa e pH controlado (a) antes e (b) após a mistura reacional.	46
Figura 12.	Espectros de extinção de suspensões de nanopartículas de Au/AH com citrato obtidas em diversas sínteses e Au/citrato pela síntese proposta por Lee e Meisel.	48
Figura 13.	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para NP Au-AH e citrato sintetizadas em estufa nos valores de pH a) 3, b) 6 e c) 10 , em diferentes magnificações.	50
Figura 14.	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para NP Au-HA e citrato sintetizadas sob refluxo nos valores de pH a) 3 e b) 6.	51
Figura 15.	Espectros das NPs Au/AH e citrato, com $\lambda_0 = 632,8$ nm	53
Figura 16.	Espectros SERS do corante vermelho do Congo (VC) $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ adsorvido em nanopartículas Au/AH e citrato sintetizadas em estufa ($\lambda_0 = 632,8$ nm).	54
Figura 17.	Espectros SERS do azul do Nilo (AN) $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ adsorvido em nanopartículas de Au/AH e citrato sintetizadas em estufa, a) com $\lambda_0 = 632,8$ nm, b) com $\lambda_0 = 785$ nm e c) espectro Raman do AN em solução com $\lambda_0 = 632,8$ nm.	54
Figura 18.	Espectro SERS do a) AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ e b) VC $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ adsorvido em nanopartículas Au/AH e citrato sintetizadas em refluxo ($\lambda_0 = 632,8$ nm).	57
Figura 19.	Espectros SERS de a) AM e b) eosina Y adsorvidos em nanopartículas Au/AH e citrato em pH 3 e pH 6 e Au/citrato sintetizadas sob refluxo ($\lambda_0 = 785$ nm).	58
Figura 20.	Espectros de extinção de NPs de Au-citrato com modificação da superfície através da adição de solução de AH em diferentes concentrações.	60
Figura 21.	Espectros SERS das NPs de Au-citrato na ausência e presença de ácido húmico modificando sua superfície, em diferentes concentrações.	61
Figura 22.	Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ adsorvido em NPs de Au/AH sintetizadas sob refluxo em pH 6 com centrifugação em diferentes rotações e utilização do sobrenadante ($\lambda_0 = 632,8$ nm).	62

Figura 23.	Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ adsorvido em NPs Au sintetizadas sob refluxo com adição de AH pH 6 após a síntese e Au sem AH ($\lambda_0 = 632,8$ nm).	63
Figura 24.	Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ adsorvido em nanopartículas de Au na ausência e na presença de ácidos húmicos em pH 6, com suspensões diluídas ($\lambda_0 = 632,8$ nm).	64
Figura 25.	Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em nanopartículas de Au/AH sintetizadas sob refluxo com adição de ácido húmico pH 6 após a síntese e em nanopartículas Au/citrato ($\lambda_0 = 632,8$ nm).	65
Figura 26.	Espectros SERS de nanopartículas de Au modificadas pela adição de AH $2,5 \times 10^{-3}$ gL ⁻¹ , e Au/citrato, com VJ $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ ($\lambda_0 = 632,8$ nm). Na parte inferior, fórmula estrutural do corante com destaque para os grupamentos responsáveis pelas frequências vibracionais indicadas nos espectros.	66
Figura 27.	Fórmulas estruturais do azobenzeno e da fenazina.	67
Figura 28.	Espectros SERS de eosina Y $1,0 \mu\text{molL}^{-1}$ adsorvida em nanopartículas de Au sintetizadas sob refluxo com adição de ácido húmico pH 6 após a síntese, e Au/citrato ($\lambda_0 = 785$ nm).	68
Figura 29.	Espectros de extinção das nanopartículas de Au/AHSS e Au/AHSS com citrato sintetizadas sob refluxo, sem controle de pH do AHSS, o qual foi medido em 7,5.	70
Figura 30.	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para NP Au/AHSS obtidas sob refluxo sem controle de pH.	71
Figura 31.	Espectros SERS para AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em NPs Au/AHSS sem centrifugar, somente o precipitado redispersado e somente o sobrenadante ($\lambda_0 = 632,8$ nm).	72
Figura 32.	Espectro de extinção de NPs Au/AHSS em diferentes valores de pH controlado antes da mistura reacional.	74
Figura 33.	Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em nanopartículas de Au/AHSS preparadas com controle de pH antes da mistura reacional ($\lambda_0 = 632,8$ nm).	75
Figura 34.	Espectros de extinção de NPs Au/AHSS obtidas por diferentes métodos de síntese.	76
Figura 35.	Espectro SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ adsorvido em NPs Au/AHSS com pH 6 controlado após mistura e obtidas em soluções concentradas e diluídas em quatro vezes ($\lambda_0 = 632,8$ nm).	77

Figura 36.	Espectro SERS de AN em diferentes concentrações molares adsorvido em NPs Au/AHSS com pH 6 controlado após mistura e obtidas em soluções diluídas em quatro vezes ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$).	78
Figura 37.	Dependência da intensidade da banda em 590 cm^{-1} em relação às concentrações do corante AN.	79
Figura 38.	Espectro SERS de AN $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ adsorvido em NPs Au/AHSS com controle de pH 6 após mistura e obtido com soluções concentradas e diluídas, ambas com centrifugação e redispersão do precipitado ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$).	80
Figura 39.	Espectro SERS de VJ $1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ adsorvido em NPs Au/AHSS com controle de pH 6 após mistura e obtido com soluções concentradas e diluídas, com centrifugação e redispersão ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$).	81
Figura 40.	Espectros SERS para VJ $10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ adsorvido em NPs de Au/AHSS com controle de pH 6 após mistura com soluções diluídas, antes e após centrifugação e redispersão com ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$).	82
Figura 41.	Espectros SERS para a) VC $1,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$) e b) eosina $1,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ ($\lambda_0 = 785 \text{ nm}$) adsorvidos em NPs Au/AHSS com controle de pH 6 após mistura com soluções diluídas e após centrifugação e redispersão.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Modos vibracionais (cm^{-1}) observados nos espectros Raman e SERS do VJ (na presença e ausência de ácidos húmicos) e atribuições vibracionais tentativas.	67
Tabela 2	Composição elementar média do ácido húmico, ácido húmico sal sódico e ácido húmico extraído de solos	69
Tabela 3	Comportamento comparativo das propriedades das NPs funcionalizadas por ácidos húmicos obtidas através de diferentes abordagens.	84
Tabela 4	Comportamento comparativo do desempenho das NPs funcionalizadas por ácidos húmicos obtidas através de diferentes abordagens, como substratos SERS-ativos na detecção do AN $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	19
1.2 Espectroscopia Raman e Efeito SERS (<i>Surface-enhanced Raman scattering</i>)...	22
<i>1.2.1. Mecanismos para intensificação do espalhamento Raman.....</i>	24
1.2.1.1 Mecanismo Eletromagnético	25
1.2.1.2 Mecanismo Químico.....	27
1.3 Nanopartículas metálicas	28
<i>1.3.1 Nanoestruturas e química interfacial.....</i>	32
1.4 Corantes têxteis	35
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	37
2.1 Objetivos	37
2.2 Justificativa	37
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	39
3.1 Equipamentos e materiais.....	39
<i>3.1.1 Reagentes.....</i>	39
<i>3.1.2 Equipamentos</i>	39
3.2 Síntese e modificação das nanopartículas de ouro	40
<i>3.2.1 Primeira abordagem.....</i>	40
<i>3.2.2 Segunda abordagem.....</i>	41
3.2.2.1 Método do citrato	42
<i>3.2.3 Terceira abordagem</i>	42
<i>3.2.4 Quarta abordagem</i>	43
3.3 Preparação das amostras para medidas dos espectros SERS e microscopia eletrônica.....	44

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Caracterização e desempenho das nanopartículas como substratos SERS-ativos sintetizadas através de diferentes metodologias	45
4.1.1 Primeira abordagem: uso de ácido húmico como agente estabilizante e redutor	45
4.1.2 Segunda abordagem: utilização de citrato de sódio e ácidos húmicos.....	47
4.1.2.1 Caracterização eletrônica e morfológica	48
4.1.2.2 Estudo SERS	52
4.1.3 Terceira abordagem: redução por citrato de sódio, e posterior modificação superficial por ácido húmico.....	60
4.1.4. Quarta abordagem: uso de ácido húmico sal sódico como agente estabilizante e redutor	68
5. CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	90

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Cintia Regina Petroni

Local e data de nascimento: São Paulo, 27 de julho de 1979

EDUCAÇÃO

Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, 2004.
Engenharia Química.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Licenciatura em Química, Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, 2005.

Lato Sensu em Química, Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, 2008.

OCUPAÇÃO

Professora de Química para alunos de Ensino Médio e Técnico nas escolas:

- Colégio Albert Sabin desde janeiro/2010
- Colégio Rumo desde janeiro/2009
- Escola Técnica Paulistano desde fevereiro/2011
- Escola Técnica Tiquatira desde fevereiro/2011

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse por questões ambientais tem sido intensificado e muitas discussões a respeito desse tema têm ocorrido, sendo a área ambiental objeto de diversas pesquisas científicas. Uma das razões para esse fato é a grande preocupação que vem sendo depositada em problemas causados pelo avanço tecnológico. Uma das atividades que têm causado significativo impacto ambiental é a atividade têxtil. Isto se deve ao fato de que indústrias de pequeno, médio ou grande porte têm em comum o uso de grande quantidade de água durante o processo industrial, e um baixo aproveitamento de insumos (corantes, detergentes, amaciantes, etc) levando à geração de um volume grande de resíduos com alta concentração de compostos orgânicos e fortemente coloridos (KUNZ *et al.*, 2002). Uma vez descartados, estes poluentes interagem de alguma forma com a matéria orgânica do solo, cuja composição majoritária é de substâncias húmicas.

As interações entre as matrizes orgânicas e inorgânicas do ambiente e compostos poluentes é um importante fator que determina a mobilidade, a reatividade e a biodisponibilidade de tais compostos no ambiente. Este trabalho visa a investigação da natureza das interações específicas de poluentes orgânicos com o meio orgânico do ambiente – aqui representado por ácidos húmicos – através de técnicas espectroscópicas avançadas. O enfoque das análises é dado às metodologias de espectroscopia vibracional Raman intensificadas, particularmente o efeito SERS (*surface-enhanced Raman Scattering*). É dada ênfase ao estudo da interação de corantes têxteis com ácidos húmicos comerciais, representando o meio orgânico, utilizando como mediadoras do processo óptico intensificado nanopartículas de ouro.

1.1 Substâncias Húmicas

Os compostos orgânicos presentes em solos, turfas e sedimentos, em vários estágios de degradação, obtidos através de ação química ou biológica, podem apresentar estrutura definida – substâncias não-húmicas (carboidratos, proteínas, aminoácidos) – ou estrutura complexa e indefinida – substâncias húmicas (SH) (ROCHA; ROSA, 2003).

As substâncias húmicas não têm composição química definida, são formadas pela degradação química e biológica de resíduos vegetais e animais, e da atividade de microorganismos, e apresentam um papel importante no transporte e destino de compostos no ambiente. Além da complexidade de sua estrutura, são caracterizadas por possuir alto peso molecular, serem amorfas, hidrofílicas e ácidas (ALVAREZ-PUEBLA; SANTOS; AROCA, 2007). Representam um conjunto de compostos heterogêneos responsável pela maior parcela da matéria orgânica natural não-viva em águas, sedimentos e solos (SENESI; LOFREDO, 1999). Devido à complexidade de sua estrutura, são operacionalmente classificadas de acordo com sua solubilidade em água como: i) ácidos húmicos, os quais são insolúveis em pH baixo - menor que 2 (massa molar: 5000 - 1×10^6 g/mol), ii) ácidos fúlvicos, os quais possuem menores massas molares (massa molar: 200 - 2000 g/mol) e são solúveis em qualquer pH, iii) huminas, caracterizadas por altas massas molares e insolúveis em qualquer pH.

Além de sua grande abundância no ambiente, também são características das substâncias húmicas a existência de muitos grupos funcionais associados à matriz poliaromática de tamanho variado (Figura 1). Os grupos funcionais comumente encontrados em substâncias húmicas incluem grupos funcionais ácidos (carboxilas,

fenólicos), neutros (álcool, éter, aldeído, éster, cetona), e básicos (amina, amida). As substâncias húmicas são ainda caracterizadas por sua natureza anfifílica e caráter coloidal, o que confere a estas substâncias uma grande capacidade de interação com poluentes orgânicos (REBBURN; MEIR; LAOR, 1998) e inorgânicos (YATES III; VON WANDRUSZKA, 1999). Por esta razão, são responsáveis por diversas propriedades dos solos, tais como redução e complexação de íons metálicos presentes em águas e solos, adsorção, solubilização, hidrólise e transporte de xenobióticos. Colaboram ainda na retenção de calor, manutenção da umidade e das condições reacionais do solo, e no fornecimento de nutrientes para o crescimento das plantas.

Figura 1. Um dos modelos propostos para a estrutura de um ácido húmico (SCHULTEN; SCHNITZER, 1993).

Existem várias vias de formação das substâncias húmicas durante a decomposição da matéria orgânica. Segundo Stevenson (1994), são quatro as vias principais de formação das SH, conforme ilustrado na Figura 2.

As quatro vias devem ser consideradas como possíveis mecanismos para a síntese de ácidos húmicos e fúlvicos na natureza, incluindo a açúcar-amino

condensação (via 1). O percurso 4 indica que substâncias húmicas representam ligninas modificadas. Já as vias 2 e 3 representam um processo que ocorre a partir de quinonas. Este último sendo o mais aceito pela maioria dos pesquisadores. As quatro vias podem ocorrer em todos os solos, embora diversos fatores definirão em qual grau ou ordem de importância cada uma predominará.

Figura 2. Mecanismos para a formação de substâncias húmicas. Compostos nitrogenados reagem com ligninas modificadas (via 4), quinonas (vias 2 e 3) e açúcares (via 1). Adaptado de Stevenson (1994).

1.2 Espectroscopia Raman e Efeito SERS (*Surface-enhanced Raman scattering*)

Dentre as técnicas para o estudo de estrutura e reatividade em superfícies, a espectroscopia Raman e a espectroscopia de absorção no infravermelho têm papel de destaque. A espectroscopia de adsorbatos no infravermelho foi desenvolvida primeiro, sendo bastante comum a detecção de monocamadas por essa técnica, devido à sua alta seção de choque (YATES; MADEY, 1987). Já a espectroscopia Raman possui uma seção de choque muito baixa (ca. $10^{-30} \text{ cm}^2 \text{ Sr}^{-1} \text{ molécula}^{-1}$) (LONG, 2001), o que a tornaria inviável para o estudo de monocamadas em superfícies. Entretanto, observa-se que na presença de superfícies metálicas nanoestruturadas, o sinal Raman é intensificado.

Embora através de ambas as técnicas (infravermelho e Raman) seja possível obter informações vibracionais, fisicamente, os processos são distintos.

A espectroscopia no infravermelho envolve essencialmente a interação ressonante entre fótons na região do infravermelho e os estados vibracionais de uma molécula, sendo que a energia do fóton absorvido deve ser igual à diferença de energia entre dois estados vibracionais (processo ressonante).

A espectroscopia Raman resulta do espalhamento inelástico de luz através da matéria. Neste processo, a radiação espalhada pode ter a mesma frequência da radiação incidente (espalhamento elástico ou Rayleigh) ou frequência modificada (espalhamento inelástico ou Raman: Stokes ou anti-Stokes) (Figura 3). Esta variação da frequência corresponde à diferença de energia entre dois níveis vibracionais, e fornece, portanto, informações sobre características vibracionais das espécies químicas em questão.

Figura 3. Mecanismos para espalhamento da radiação elástico (Rayleigh) e inelásticos (Stokes e Anti-Stokes).

A intensificação do sinal Raman em moléculas adsorvidas em superfícies metálicas foi observada pela primeira vez por Fleischmann, Hendra e McQuillan, em 1974, através de estudos espectroscópicos da molécula de piridina adsorvida em eletrodo de prata. Inicialmente atribuiu-se essa intensificação ao aumento da área superficial do eletrodo, uma vez que só era observada após ciclos de oxidação-redução. Porém, em 1977, Jeanmarie e Van Duyne e Creighton e Albrecht concluíram que o fenômeno da intensificação não decorria apenas do aumento da área superficial, uma vez que a intensificação era da ordem de 10^6 vezes e o aumento da área, 10^2 vezes. Essa intensificação do sinal Raman observada em espécies adsorvidas em superfícies metálicas especialmente preparadas recebe o nome de efeito SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*).

A descoberta do efeito SERS despertou o interesse pelo estudo e aprimoramento desta técnica, a qual mostrou-se muito abrangente e viável, uma vez que a espectroscopia Raman requer pouca preparação e quantidades pequenas de amostras, possibilita que a análise seja feita em espécies em solução aquosa, além de ser uma técnica não destrutiva.

Outros fenômenos de intensificação também são conhecidos como, por exemplo, a espectroscopia no infravermelho intensificada pela superfície (SEIR, *Surface enhanced infrared*) (LE *et al.*, 2008) e fluorescência intensificada por superfície (SEF - *Surface enhanced fluorescence*) (FORT; GRÉSILLON, 2008; GUERRERO; AROCA, 2011).

1.2.1. Mecanismos para intensificação do espalhamento Raman

Diante da descoberta do efeito SERS foi necessário buscar modelos para compreendê-lo. Para explicar o fenômeno da intensificação do sinal Raman para moléculas adsorvidas em superfícies metálicas nanoestruturadas admite-se em geral que o efeito SERS ocorre devido a dois mecanismos de origens diferentes, um de origem eletromagnética e outro de origem eletrônica (ou química, de transferência de carga). O mecanismo de origem química envolve a transferência de carga do metal para a molécula adsorvida ou vice-versa, considerando as modificações na polarizabilidade molecular, geradas a partir da interação da substância com o metal, interação esta que pode ser uma ligação química com a superfície, formação de complexos de transferência de carga, ou formação de par iônico. O mecanismo eletromagnético ocorre devido à intensificação do campo elétrico nas proximidades da superfície em função da interação da ressonância com o plasma de superfície (FARIA; TEMPERINI; SALA, 1999). Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente, dependendo do sistema em análise.

1.2.1.1 Mecanismo Eletromagnético

Alguns metais são caracterizados pela presença de elétrons livres em sua superfície, movimentando-se em meio de íons positivos fixos. A oscilação desses elétrons sob irradiação de uma onda eletromagnética pode ocorrer na frequência do plasma. Oscilações quantizadas do plasma são denominadas de plasmons (XIA; HALAS, 2005). Quando uma radiação incide sobre uma superfície metálica, desde que a frequência da radiação esteja próxima à de excitação dos plasmons superficiais do metal, ocorre uma intensificação do campo elétrico em suas proximidades.

Caso haja ressonância entre a frequência de radiação e do plasmon superficial, o campo elétrico nas proximidades do metal pode ser significativamente maior do que o campo aplicado, devido à polarização do sólido. A existência de ressonâncias de plasmons em nanoestruturas é uma condição necessária para a observação do efeito SERS, e define a base teórica para a explicação do mecanismo eletromagnético envolvido nesse efeito.

Assim, quando luz incide nessas superfícies plasmônicas, os elétrons de condução do metal são excitados, induzindo a excitação de plasmons superficiais, os quais levam a uma enorme intensificação de campos eletromagnéticos, dando origem a fenômenos ópticos intensificados, como o SERS, que podem ser usados para a detecção ultra-sensível de espécies químicas.

O efeito SERS é fundamentalmente um fenômeno associado à intensificação de um campo eletromagnético ao redor de uma pequena porção de um metal excitado próximo a uma intensa ressonância dipolar. O campo eletromagnético

intensificado interage com o adsorbato, resultando na intensificação do sinal Raman de tal espécie.

Esse mecanismo não depende da natureza química da molécula, pois não altera sua polarizabilidade, nem do tipo de interação molécula-metal, porém está fortemente relacionado ao tamanho e formato da estrutura metálica, conforme ilustrado na Figura 4, e da distância entre molécula e metal, observando-se melhor desempenho em estruturas com ordem de grandeza de algumas dezenas de nanômetros.

Figura 4. Representação da intensificação do campo elétrico para nanopartículas de diversas formas, representadas pela região central. (a) esfera; (b) triângulo; (c) cilindro; (d) elipsoide. As escalas à direita de cada figura indicam o valor da intensificação do campo elétrico local em relação ao campo elétrico incidente ($E_{\text{local}}/E_{\text{incidente}}$). Os valores escritos em vermelho em cada figura indicam o comprimento de onda da radiação excitante, que corresponde ao máximo de extinção das nanopartículas. Adaptada de Schatz *et al.* (2003, 2004). Direitos autorais: 2010, American Chemical Society.

A Figura 5 mostra o espectro de extinção de um filme de prata de 5nm, no qual é possível observar uma larga banda de absorção do *plasmon* superficial, com máximo de absorção em 475 nm. É possível perceber que a intensificação do campo elétrico ocorreria para radiações com comprimento de onda entre 320 e 700 nm, dentro da banda de extinção.

Figura 5. Espectro de absorção de um filme de prata de 5 nm em vidro (CORIO, 1998).

1.2.1.2 Mecanismo Químico

O mecanismo químico, ou de transferência de carga, envolve a ressonância entre a radiação incidente e um estado eletrônico gerado pela adsorção química da molécula na superfície metálica, estado intermediário de transferência de carga (LOMBARDI *et al.*, 1986). Este estado é resultado da interação eletrônica entre metal e molécula, o que nos permite concluir que o mecanismo químico depende da natureza química molecular, diferente do eletromagnético, além de poder ser observado somente em distâncias pequenas entre adsorbato e superfície metálica, distância essa não muito maior que a de uma ligação química.

O modelo proposto é o de adsorção química a partir da interação eletrônica entre orbitais moleculares do adsorbato e elétrons de condução do metal, quimiossorção essa que ocorrerá em função da excitação causada pela radiação magnética e provocação de dois tipos de transferência de carga: i) transferência de elétrons de orbitais ocupados (HOMO = *highest occupied molecular orbital*) da molécula adsorvida para estados do metal acima do nível de Fermi (E_F) e ii)

transferência de elétrons do metal abaixo do nível de Fermi para orbitais não ocupados do adsorbato (LUMO = *lowest unoccupied molecular orbital*).

Para exemplificar, o modelo propõe que ao receber o fóton incidente, o elétron do metal é excitado criando um par elétron-buraco. Este elétron é transferido para a molécula adsorvida, alterando sua configuração. Em seguida este elétron retorna ao seu nível de origem, no metal, fazendo com que a molécula adsorvida fique excitada vibracionalmente. Quando a molécula retorna a seu estado fundamental, origina o fóton espalhado. A inclusão dos estados eletrônicos do metal possibilita a ocorrência de transições eletrônicas com menores de energia do que as intrínsecas da molécula adsorvida.

1.3 Nanopartículas metálicas

O foco deste trabalho está principalmente na síntese, caracterização e potenciais aplicações de nanoestruturas metálicas – mais especificamente de ouro. Dessa forma, discutimos a seguir alguns aspectos importantes sobre as propriedades desses materiais.

Estruturas que têm pelo menos uma de suas dimensões menor que 100 nm são denominadas de nanoestruturas. O desenvolvimento de nanoestruturas e o estudo de suas propriedades e aplicações têm sido área de significativo interesse atual, onde a Química ocupa um papel fundamental (THOMAS; KAMAT, 2003). O interesse despertado por tais nanoestruturas deve-se, em grande parte, pelas suas peculiares propriedades ópticas.

Conforme já discutido anteriormente, fenômenos de intensificação do sinal Raman são preferencialmente observados em estruturas metálicas em escala

nanométrica. Daí a importância em estudar e aprimorar processos de obtenção de nanoestruturas metálicas, buscando métodos que possibilitem o controle do tamanho e do formato das mesmas, uma vez que a dimensionalidade está intimamente relacionada com propriedades físico-químicas, eletrônicas e óticas diferenciadas, devido a efeitos de confinamento de elétrons e alta área superficial.

Estudos têm mostrado que o controle preciso da dimensionalidade de nanopartículas metálicas possibilita controlar os comprimentos de onda nos quais essas nanoestruturas absorvem ou espalham radiação. Nanoestruturas metálicas apresentam ressonâncias de plasmons localizadas que dependem da geometria da partícula, e essa é uma das razões que estão por trás do grande interesse no desenvolvimento de metodologias que possibilitem o desenho e fabricação de maneira controlada de uma nanoestrutura que combina ressonância de plasmon controlável com grande intensificação. As figuras 6 e 7 apresentam a variabilidade da posição da ressonância do plasmon superficial de nanopartículas de ouro e prata de diferentes geometrias.

As propriedades ópticas do plasmon ressonante resultante da interação da radiação incidente com o plasma de superfície do metal dependem da polarização da distribuição de carga na nanoestrutura, a qual é determinada pela forma da nanopartícula metálica (WILEY *et al.*, 2007), do tamanho e distância interpartícula (TIAN; TATSUMA, 2005).

Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão – MET (topo), espectro de absorção (à esquerda) e fotografias (à direita) de soluções aquosas de nanopartículas de ouro em diferentes tamanhos. Escala: 500 nm para a e b, 100 nm para c, d, e. Adaptado de Murphy *et al.* (2005).

Figura 7. Ilustração esquemática de formas diferentes de nanoestruturas (topo). Adaptado de Xia e Halas (2005). Lista de nanopartículas e ouro e prata em várias morfologias, composições e estruturas em conjunto com suas típicas localizações de máximo de absorção na ressonância de *plasmon* de superfície na região do visível (SUN; XIA, 2003).

Existem alguns processos de obtenção de nanopartículas metálicas, os quais são fundamentados em métodos físicos e químicos. O método físico baseia-se na

deposição por vapor, enquanto que o químico baseia-se na redução de íons metálicos, cujo agente redutor já bastante difundido é o citrato de sódio (LEE; MEISEL, 1982), seguido do controle de agregação dos átomos do metal. Este último método viabiliza maior controle do tamanho e da forma das nanopartículas.

Há uma vasta gama de estudos em relação a diferentes métodos de síntese de nanopartículas metálicas, especialmente de ouro e prata. Nanoestruturas de Ag e Au são os materiais apresentando a maior atividade SERS no visível. A Figura 8 apresenta exemplos de imagens obtidas por MET e microscopia de força atômica (MFA) de nanoestruturas, obtidas por metodologias de sínteses diferentes.

Figura 8. Imagens MET de (a) nanopartículas de prata obtidas por redução com citrato, (b) nanopartículas de ouro obtidas por redução com borohidreto, e (c) nano-hastes de ouro, (d) nanoquadrados de ouro e seus padrões de difração. Imagens MFA de (e) filme de nanopartículas de ouro incorporadas em filme de quitosana e (f) nanofios de prata (AROCA *et al.*, 2005).

1.3.1 Nanoestruturas e química interfacial

O interesse nas nanopartículas metálicas advém, portanto, em grande parte de suas propriedades físicas dependentes de seu tamanho e formato, e das interações químicas entre esses materiais e diferentes sistemas, tais como sistemas de interesse ambiental. As aplicações desses materiais dependem de maneira fundamental das interações entre essas nanopartículas e diferentes espécies químicas. Assim, a funcionalização da superfície de uma nanoestrutura é fundamental na determinação de suas propriedades químicas e potenciais aplicações. A química interfacial de nanoestruturas metálicas determina, portanto, suas propriedades químicas e possibilidades de aplicações.

Existem evidências experimentais de que os parâmetros de síntese desempenham um papel central na determinação da forma da nanoestrutura e das suas propriedades químicas superficiais (MURPHY *et al.*, 2010). A síntese de nanopartículas de ouro e prata com controle sobre a distribuição de tamanhos e formas geralmente envolve, como abordagem geral, o uso de agentes estabilizantes, como, por exemplo, surfactantes (YANG *et al.*, 2010), e no caso do presente trabalho, ácidos húmicos. Tais procedimentos levam a formação de nanoestruturas cujas superfícies estão quimicamente modificadas, conforme sugerido na Figura 9, que utiliza como exemplo uma nanoestrutura preparada em meio a surfactantes.

Figura 9. Esquema representativo de uma bicamada de surfactante sobre a superfície de uma nanoestrutura metálica, mostrando três regiões que podem estar envolvidas em diferentes processos químicos - adaptado de Murphy *et al.* (2010).

Para muitas aplicações, a natureza da chamada “soft shell” ao redor de uma nanoestrutura pode ser ainda mais importante para processos químicos interfaciais do que o próprio centro metálico em si (BAIGORRI *et al.*, 2008). A química interfacial de nanoestruturas metálicas determina, portanto, suas propriedades químicas e possibilidades de aplicações.

O efeito SERS é hoje reconhecido como importante técnica analítica na caracterização de adsorbatos em superfícies, e de transformações químicas ocorrendo em superfícies metálicas. Assim, a técnica SERS poderá ser utilizada na elucidação de processos químicos interfaciais entre nanoestruturas e as moléculas que modificam sua superfície. Os processos de modificação química podem ser úteis para: i) estabilizar o substrato; ii) servir como padrão interno para medidas quantitativas; iii) possibilitar a preparação do substrato de maneira reproduzível; e iv) criar uma afinidade específica com o objeto de análise.

Nesse trabalho, o interesse recai em nanopartículas modificadas por ácidos húmicos. Foi demonstrada a obtenção de nanopartículas de ouro com propriedades

ópticas intensificadas (DOS SANTOS *et al.*, 2005) utilizando substâncias húmicas como agentes redutores (WOOD, 1996; MACHESKY; ANDRADE; ROSE, 1992), em suas diferentes frações (BAIGORRI *et al.*, 2008). Foi sugerido que tais nanoestruturas apresentam propriedades plasmônicas adequadas para seu emprego em processos ópticos intensificados, tais como o efeito SERS (BAIGORRI *et al.*, 2008). As propriedades redox das substâncias húmicas estão relacionadas a grupos hidroquinonas (SCHWARZENBACH *et al.*, 1990; BAUER *et al.*, 2007) e fenólicos (STRUYK; SPOSITO, 2001).

Os ácidos húmicos foram empregados em funcionalizações de sistemas multicamadas na detecção de poluentes (CRESPILO *et al.*, 2005) e na detecção de 2-naftilamina e piridina (ALVAREZ-PUEBLA; SANTOS; AROCA, 2007). Nanoestruturas de ouro sintetizadas a partir de ácidos húmicos mostraram-se substratos SERS-ativos bastante eficientes na detecção de poluentes ambientais (ALVAREZ-PUEBLA; SANTOS; AROCA, 2007). Ácidos húmicos foram utilizados, também, na proteção de nanopartículas de prata e como receptores para a detecção de herbicidas (DUBAS; PIMPAN, 2008).

A grande quantidade de grupos funcionais nas substâncias húmicas confere a elas uma significativa interação com xenobióticos orgânicos (REBBURN; MEIR; LAOR, 1998) e inorgânicos (TIPPING, 2002). Assim, considerando o uso de tais sistemas híbridos Au-ácidos húmicos como substratos SERS-ativos, os ácidos húmicos podem atuar como uma fase de extração associada à plataforma SERS, favorecendo assim a interação entre substâncias orgânicas hidrofóbicas e as nanopartículas metálicas.

1.4 Corantes têxteis

O foco deste trabalho reside no uso de nanopartículas de ouro modificadas por ácidos húmicos como sensores para a determinação de corantes orgânicos têxteis. Estima-se que de 1 a 15% dos corantes utilizados pelas indústrias têxteis são perdidos durante o processo de tingimento e liberados nos efluentes, resultando na interferência da vida aquática (VAUTIER; GUILLARD; HERRMANN, 2001; DE SOUZA, Selene; PERUZZO; DE SOUZA, Antônio, 2008). Corantes têxteis são, portanto, uma importante classe de poluentes ambientais, e a natureza da interação entre tais espécies e ácidos húmicos é fator importante na determinação de seu comportamento e de seu destino ambiental. Dentre os corantes têxteis destacam-se os chamados azocorantes, os quais são caracterizados pela existência de um ou mais agrupamentos $-N=N-$ ligados a anéis aromáticos, tais como o vermelho do Congo e o verde de Janus, e os corantes de estrutura heterocíclica, como o azul do Nilo. Os azocorantes representam cerca de 60% dos corantes utilizados atualmente no mundo e há estudos que mostram que os azocorantes e alguns de seus subprodutos são carcinogênicos e mutagênicos (BROWN; DEVITO, 1993).

A Figura 10 apresenta a estrutura molecular dos corantes investigados neste trabalho.

<p>Vermelho do Congo</p> <p>azocorante aniônico</p>	<p>Verde de Janus</p> <p>azocorante catiônico</p>
<p>Azul do Nilo</p> <p>corante fenoxazínico catiônico</p>	<p>Azul de metileno</p> <p>corante fenoxazínico catiônico</p>
<p>Eosina Y</p> <p>corante aniônico</p>

Figura 10. Fórmulas estruturais dos corantes utilizados.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

2.1 Objetivos

Este trabalho tem como objetivos gerais investigar as propriedades de suspensões de substâncias húmicas como agentes redutores e estabilizantes para a formação de nanoestruturas de ouro e caracterizar o desempenho das nanopartículas (NPs) sintetizadas como sensores de poluentes orgânicos (corantes) através de técnicas de espectroscopia vibracional, especificamente através do efeito SERS.

Os objetivos específicos deste trabalho incluem:

- estudo e desenvolvimento de metodologias para a síntese de nanopartículas coloidais de ouro na presença de substâncias húmicas;
- avaliar o potencial dessas nanopartículas como substratos na detecção de corantes têxteis através do efeito SERS;
- investigar a possibilidade de estudar a natureza das interações específicas existentes entre diferentes classes de corantes e substâncias húmicas (estudar as interações específicas existentes entre diferentes classes de corantes e os grupos funcionais presentes em substâncias húmicas) através do efeito SERS.

2.2 Justificativa

O interesse no uso dos ácidos húmicos para o preparo de nanoestruturas modificadas visando aplicações como substratos SERS para a detecção de poluentes se deve aos seguintes fatores:

- sua habilidade em reduzir íons Au^{3+} levando a formação de nanoestruturas (devido as suas propriedades redutoras, relacionadas principalmente aos grupos funcionais quinonas e fenóis);

- seu caráter de polieletrólito, o qual permite a estabilização das nanopartículas de ouro e o controle sobre o seu tamanho (atuando como um *template* polimérico);
- sua significativa afinidade com diversos poluentes orgânicos e inorgânicos (devido a sua natureza anfifílica e grande quantidade de grupos funcionais), permitindo que favoreçam a interação entre a nanopartícula SERS-ativa e a espécie química de interesse (atuando como uma fase de extração associada ao substrato SERS, aumentando assim a sensibilidade da técnica).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e materiais

3.1.1 Reagentes

Os seguintes reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich ou Merck, e foram usados sem purificações adicionais:

- ácido húmico;
- ácido húmico sal sódico;
- ácido tetracloroáurico triidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$);
- hidróxido de sódio (NaOH);
- ácido nítrico (HNO_3);
- corantes: azul do Nilo, vermelho do Congo, azul de metileno, verde de Janus e eosina Y.

3.1.2 Equipamentos

Os espectros Raman foram obtidos utilizando-se o espectrômetro Raman inVia Reflex (Renishaw, A-9803-0413) acoplado a microscópio óptico, equipado com detector CCD e laser hélio-neônio (radiação em 632,8 nm) e laser de diodo (radiação em 785 nm) e o espectrômetro Raman Renishaw 3000 acoplado a um microscópio óptico, equipado com detector CCD e lasers de argônio (radiação em 514,5 e 488,0 nm) e hélio-neônio (radiação em 632,8 nm).

Os espectros eletrônicos de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro UV-VIS-NIR Shimadzu, modelo UV-3101PC, que permite a obtenção de espectros ópticos por transmissão e reflexão na região entre 190 nm e 3200 nm.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM, Scanning Electron Microscopy) foram obtidas no equipamento JEOL microscópio, Mod.: FEG-SEM JSM 6330F (IQ-USP).

3.2 Síntese e modificação das nanopartículas de ouro

Descrevemos a seguir os diferentes procedimentos utilizados na preparação e modificação superficial das nanopartículas de ouro, a saber:

- **Primeira abordagem:** uso de ácido húmico como agente estabilizante e redutor (pH entre 1 e 13). Controle de pH antes e depois da adição de ácido húmico;
- **Segunda abordagem:** uso de ácido húmico e citrato de sódio (pH 3, 6 e 10);
- **Terceira abordagem:** redução por citrato de sódio, e posterior modificação superficial por ácido húmico (pH 6);
- **Quarta abordagem:** uso de ácido húmico sal sódico como agente estabilizante e redutor (pH 3; 6; 7,5 e 10).

3.2.1 Primeira abordagem

Para a síntese das nanopartículas de ouro e ácido húmico (Au/AH) foram preparadas soluções aquosas de ácido húmico 0,250 g.L⁻¹, o qual atuou como agente estabilizante e redutor, segundo Aroca, Alvarez-Puebla e Santos (2007). Em cada amostra da solução húmica foi adicionado igual volume de solução aquosa de

HAuCl_4 $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e o pH foi controlado pela adição de solução de NaOH ou HNO_3 . O volume da solução ácida e básica foi variado de modo a alterar da menor maneira possível o volume e a concentração da amostra inicial. As amostras foram preparadas em uma faixa de pH entre 1 e 13. Em um primeiro momento, o controle de pH foi realizado durante a síntese das nanopartículas, quando as soluções de ácido húmico e ácido tetracloroaurico já haviam sido misturadas. Posteriormente, foram preparadas amostras cujo controle de pH foi realizado para a solução de ácido húmico, antes da adição de HAuCl_4 .

Após o preparo das amostras de pH entre 1 e 13, todas foram submetidas a aquecimento (50°C) em estufa durante 5 horas.

3.2.2 Segunda abordagem

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas misturando-se volumes iguais de soluções de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e ácido húmico $0,25 \text{ g L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (3, 6 e 10).

Em decorrência da grande dificuldade encontrada em sintetizar e estabilizar a suspensão coloidal apenas com o ácido húmico, acrescentou-se solução de citrato de sódio 1% m/v na proporção de 1:10 em relação ao volume de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. O controle do pH da solução de ácido húmico foi realizado antes da mistura com a solução de ouro. Este controle deu-se pela adição de soluções de HNO_3 e NaOH em diferentes concentrações, a fim de não alterar consideravelmente o volume, e consequentemente, a concentração da solução final.

Quanto ao aquecimento, foram propostas duas alternativas: i) aquecimento em estufa, sob temperatura de 50°C , por 5 horas e ii) aquecimento da solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sob refluxo até ebulição, e a partir desse instante foram adicionadas

as soluções de ácido húmico e de citrato de sódio, simultaneamente. O aquecimento sob refluxo foi mantido por uma hora.

3.2.2.1 Método do citrato

Para efeito de comparação, foram sintetizadas nanopartículas pelo método de Lee e Meisel (1982), no qual é aquecido um volume de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ até ebulição. Adiciona-se, então, um volume dez vezes menor de solução de citrato de sódio 1% m/v. Essa mistura é mantida em ebulição, sob refluxo, por 1 hora.

3.2.3 Terceira abordagem

Nesta abordagem o objetivo foi modificar a superfície das NPs previamente preparadas através da adição do ácido húmico. Para tanto, as nanopartículas foram sintetizadas pelo método de Lee e Meisel (1982). Após a síntese foram adotados dois procedimentos para a modificação da superfície das NPs:

- i) foi adicionado volume igual de solução $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de ácido húmico, em pH 6, com homogeneização em ultrassom por 45 minutos. Feito isso, a amostra foi dividida em duas alíquotas iguais, as quais foram submetidas a centrifugação, uma a 1500 rpm (rotações por minuto) e a outra, a 3000 rpm, ambas centrifugadas por 15 minutos. Para o estudo SERS foram utilizados os sobrenadantes dessas amostras.

- ii) foi adicionado volume igual da solução de ácido húmico em diferentes concentrações ($2,5 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$, $2,5 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ e $2,5 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$), em pH 6, homogeneizando em ultrassom por 45 minutos.

Devido aos melhores resultados para a segunda abordagem terem ocorrido em pH 6, optamos por estudar essa abordagem apenas nesse pH.

3.2.4 Quarta abordagem

As nanopartículas foram sintetizadas misturando-se volumes iguais de soluções de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e ácido húmico sal sódico (AHSS) $1,00 \text{ g L}^{-1}$.

Inicialmente o AHSS foi utilizado sem modificação de pH, cujo valor utilizado foi de 7,6.

Posteriormente as sínteses ocorreram em diferentes valores de pH (3, 6 e 10), cujo controle do foi realizado de duas formas diferentes: antes e após a mistura com a solução de ouro. Essas sínteses ocorreram com as seguintes diferenças nas concentrações:

- 1ª amostra: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e AHSS 1 g L^{-1} com pH da substância húmica controlado antes da mistura reacional;
- 2ª amostra: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e AHSS 1 g L^{-1} com pH controlado após a mistura reacional;
- 3ª amostra: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e AHSS 1 g L^{-1} , porém com diluição de ambas as soluções para $\frac{1}{4}$ (um quarto) do original e com pH controlado após a mistura reacional.

O controle do pH se deu pela adição de soluções de HNO_3 e NaOH em diferentes concentrações, a fim de não alterar consideravelmente o volume, e consequentemente, a concentração da solução final. As misturas reacionais foram levadas a aquecimento sob refluxo (em ebulição por 1 hora).

3.3 Preparação das amostras para medidas dos espectros SERS e microscopia eletrônica

Em todas as abordagens, as nanopartículas foram caracterizadas por ressonância do plasmon superficial, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia vibracional (SERS).

Para a obtenção dos espectros SERS, as amostras foram preparadas pela adição de 200 μL de suspensão contendo as nanoestruturas de ouro a 2 μL de uma solução de analito de concentração $1,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$. As concentrações finais do analito foram de $1,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$.

Para a obtenção das imagens MEV, foram utilizados substratos de silício. Uma gota da suspensão coloidal foi depositada sobre a superfície do silício deixando o solvente evaporar em condições ambiente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização e desempenho das nanopartículas como substratos SERS-ativos sintetizadas através de diferentes metodologias

As propriedades particularmente importantes quando o foco é o desempenho SERS de uma nanoestrutura incluem morfologia, tamanho, forma e absorção de plasmon superficial. Tais aspectos são descritos a seguir, para as diferentes abordagens de síntese utilizadas.

4.1.1 Primeira abordagem: uso de ácido húmico como agente estabilizante e redutor

A Figura 11 mostra os espectros de extinção de suspensões de nanopartículas de ouro preparadas através da redução de HAuCl_4 por ácidos húmicos comerciais em diferentes valores de pH (controlado antes e após a síntese). A presença da banda de extinção no visível, correspondente à ressonância de plasmon superficial, confirma a obtenção de nanopartículas de ouro pela reação do ácido tetracloroáurico e ácido húmico. A redução do Au^{3+} ocorre principalmente devido à presença dos grupos funcionais fenóis e hidroquinonas, os quais são comumente encontrados em ácidos húmicos e são eficientes agentes redutores para íons de ouro (o potencial padrão de redução de substâncias húmicas é em torno de 0,78 V) (BAIGORRI *et al.*, 2008).

Pode-se notar que para alguns valores de pH as nanopartículas de ouro sintetizadas utilizando apenas ácidos húmicos comerciais como redutores e estabilizantes apresentaram extinção em torno de 550 nm, o que caracteriza

nanoesferas metálicas de ouro com dimensões de aproximadamente 80 nm (JAIN *et al.*, 2006). Para a síntese com controle de pH antes da mistura (Figura 11a), observa-se ressonância do plasmon superficial apenas nos valores de pH de 6, 11 e 12. Já para a síntese com controle de pH após a mistura (Figura 11b), a presença da banda característica de nanopartículas de ouro é observada em uma faixa maior de pH, nos valores de entre 5 e 12. Observa-se ainda que a banda de extinção é mais intensa para a síntese com controle de pH após a mistura, sugerindo a formação de mais nanopartículas nessas condições.

Figura 11. Espectros de extinção das nanopartículas de Au/AH com aquecimento em estufa e pH controlado (a) antes e (b) após a mistura reacional.

Tais nanopartículas, obtidas com o uso unicamente de ácidos húmicos apresentaram grande dificuldade de reprodutibilidade, além de não se mostrarem eficientes como substratos SERS. Por esta razão, deste ponto em diante, optou-se por utilizar alternativas na síntese das nanopartículas, entre elas, a utilização de citrato de sódio como agente redutor auxiliar.

4.1.2 Segunda abordagem: utilização de citrato de sódio e ácidos húmicos

Nessa abordagem, a metodologia proposta por Alvarez-Puebla, Santos e Aroca (2007) foi modificada, sendo que as nanopartículas de ouro foram sintetizadas em uma solução contendo citrato de sódio e ácidos húmicos, buscando melhor reprodutibilidade.

4.1.2.1 Caracterização eletrônica e morfológica

As nanopartículas obtidas nessas condições apresentaram extinção na faixa de 520 a 535 nm (Figura 12), o que caracteriza a presença de nanoesferas com dimensões entre 20 e 40 nm (JAIN *et al.*, 2006). Para efeito de comparação, a Figura 12 mostra também o espectro de extinção de nanopartículas sintetizadas apenas com citrato como agente redutor (método de Lee e Meisel).

(b)

Figura 12. Espectros de extinção de suspensões de nanopartículas de Au/AH com citrato obtidas em diversas sínteses e Au/citrato pela síntese proposta por Lee e Meisel.

Enquanto as nanopartículas preparadas pelo método de Lee e Meisel apresentam seu máximo de extinção em *ca.* 519 nm, as NPs preparadas na presença de ácidos húmicos em estufa (Figura 12a) apresentam seus máximos de extinção deslocados para valores de menores energias, sugerindo alterações na função dielétrica do entorno das nanopartículas (ϵ_m). Tais alterações podem ser atribuídas à presença de ácidos húmicos adsorvidos. Observa-se também um alargamento das bandas de extinção, sugerindo maior agregação das nanopartículas na presença de ácidos húmicos. No caso das nanopartículas obtidas em refluxo (Figura 12b), observa-se pouca variação no máximo de extinção em comparação com as partículas preparadas pelo método de Lee e Meisel.

Diante da indicação de formação da nanopartículas através dos espectros de extinção, viu-se a necessidade de obter imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a caracterização morfológica das nanoestruturas formadas. As

Figuras 13 e 14 mostram as imagens MEV obtidas para nanopartículas sintetizadas em estufa e sob refluxo em diferentes valores de pH.

Figura 13. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para NP Au/AH e citrato sintetizadas em estufa nos valores de pH a) 3, b) 6 e c) 10 , em diferentes magnificações.

Figura 14. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para NP Au/HA e citrato sintetizadas sob refluxo nos valores de pH a) 3 e b) 6.

Observa-se nas Figuras 13 e 14 uma grande dependência entre a morfologia das nanoestruturas de ouro e o pH de síntese. De fato, o mecanismo e a cinética de formação das nanopartículas depende das características das substâncias húmicas, as quais variam significativamente em função do pH (BARRIGORI *et al.*, 2008), e portanto as diferentes condições modificam os grupos funcionais disponíveis para a reação de redução (CARLETTI *et al.*, 2010).

Considerando inicialmente as nanopartículas obtidas em estufa (Figura 13), nota-se em pH 3 a formação de aglomerados com dimensões na ordem de 1 a 20 μm , sem forma definida. Estruturas com tamanho nesta ordem de grandeza não são adequadas para bom desempenho como substratos SERS. Já em pH 6 percebe-se a presença de aglomerados de partículas com tamanhos da ordem de micrômetros, formados por nanopartículas com dimensões da ordem de 20 a 40 nm. Tais características são concordantes com os o espectros de extinção e sugerem bom potencial de tais nanoestruturas como substratos SERS. A presença de agregados de nanopartículas pode contribuir para maior intensificação do sinal Raman, pois favorece a formação dos chamados hot spots (regiões de alta intensificação de campo eletromagnético). Em pH 10 nota-se a formação de

estruturas muito grandes, em formato de “árvores” com nanopartículas de pequenas dimensões ao redor das mesmas. Diante das grandes dimensões para as estruturas obtidas em pH 10 e em busca de otimização do estudo, não foram obtidos espectros para essa amostra e os estudos seguiram-se somente para pH 3 e 6.

As imagens MEV obtidas para as partículas sintetizadas sob refluxo (Figura 14) mostram a presença de estruturas de grandes dimensões, sendo que em pH 6 percebe-se maior agregação, o que pode contribuir para um melhor desempenho SERS.

4.1.2.2 Estudo SERS

A Figura 15 mostra inicialmente os espectros obtidos na ausência de corantes, a fim de avaliar a possível interferência dos ácidos húmicos. Observa-se na Figura 15 que o espectro SERS dos ácidos húmicos é muito pouco intenso, não sendo observado nas condições experimentais aqui aplicadas. De fato, os ácidos húmicos têm seção de choque Raman muito baixa (DEL VECCHIO; BLOUGH, 2004), e na presença das nanopartículas, seu espectro de emissão é significativamente suprimido, dando origem a uma janela espectral, conforme já reportado na literatura (BAIGORRI *et al.*, 2008). Dessa maneira, os ácidos húmicos não interferem significativamente no espectro observado das moléculas adsorvidas sobre as nanopartículas, possibilitando assim a detecção sensível de espécies químicas através da técnica SERS.

Figura 15. Espectros das NPs Au/AH e citrato, com $\lambda_0 = 632,8$ nm

Como moléculas alvo para avaliação do desempenho das NPs Au/AH e citrato como substratos SERS-ativos, optou-se por utilizar inicialmente os corantes têxteis vermelho do Congo (VC), de natureza aniônica, e azul do Nilo (AN), de natureza catiônica. Para o caso do AN, é importante ainda mencionar que ocorre condição de ressonância com radiação excitante em 632,8 nm, favorecendo a observação de seu espectro Raman devido ao efeito Raman ressonante.

As Figuras 16 e 17 apresentam os espectros observados para suspensões de nanopartículas Au/AH e citrato sintetizadas em estufa na presença dos corantes vermelho do Congo (VC) e azul do Nilo (AN) nas concentrações de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 16. Espectros SERS do corante vermelho do Congo (VC) $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ adsorvido em nanopartículas Au/AH e citrato sintetizadas em estufa ($\lambda_0 = 632,8$ nm).

Figura 17. Espectros SERS do azul do Nilo (AN) $1,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} adsorvido em nanopartículas de Au/AH e citrato sintetizadas em estufa, a) com $\lambda_0 = 632,8$ nm, b) com $\lambda_0 = 785$ nm e c) espectro Raman do AN em solução com $\lambda_0 = 632,8$ nm.

Os resultados das Figuras 16 e 17 mostram um comportamento diferente para os dois corantes analisados. No caso do corante VC, observa-se um sinal muito fraco para as nanoestruturas preparadas em pH 3, sendo que não se observa o espectro Raman característico do corante em pH 6. Por outro lado, é possível observar o espectro vibracional característico do AN nos espectros Raman apresentados na Figura 17, tanto com radiação excitante em 632,8 nm quanto em 785 nm, o que evidencia a atividade SERS para as NPs sintetizadas nessa abordagem. É importante também notar nos espectros SERS a significativa diminuição da fluorescência característica desse corante para em solução, conforme observado na Figura 17c. Percebe-se, também, que independente da energia da radiação excitante, o sinal mais intenso foi obtido para as nanopartículas preparadas em pH 6. De fato, a morfologia dessas partículas (Figura 13) sugeriu melhor potencial SERS para essas estruturas em comparação com aquelas preparadas em pH 3.

A figura a seguir apresenta os espectros SERS do VC e do AN obtidos utilizando-se como substrato as NPs sintetizadas sob refluxo. Nesse caso, o espectro do AN é também observado para os dois valores de pH (pH 3 e 6), conforme evidenciado pela banda em 590 cm^{-1} . Já para o VC não é possível observar as bandas características do corante.

Figura 18. Espectro SERS do a) AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ e b) VC $1,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ adsorvido em nanopartículas Au/AH e citrato sintetizadas em refluxo ($\lambda_0 = 632,8$ nm).

Em função da maior dificuldade para controlar na síntese em estufa em comparação com aquela via refluxo, optou-se por utilizar essa segunda rota para a continuação dos estudos.

Uma vez observado efeito SERS para o AN (corante catiônico) e não para o VC (corante aniônico), viu-se a necessidade de verificar uma possível seletividade das NPs em relação à carga da espécie química investigada, considerando-se uma interação de natureza eletrostática entre as nanopartículas (carregadas negativamente, uma vez que as espécies responsáveis por estabilizá-las são os ânions citrato e humato) e o adsorbato (corante). Para este fim, foram analisados espectros dos corantes azul de metileno (AM) e eosina Y, de natureza catiônica e aniônica, respectivamente. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 19, onde observa-se a presença das bandas características do AM nos espectros SERS para as NPs Au/AH como substratos, para ambos os valores de pH de síntese. Já para a eosina Y, os espectros mostraram baixo sinal, indicando adsorção preferencial de espécies catiônicas nas NPs Au/AH. Para efeito de comparação, foram obtidos também os espectros destes corantes adsorvidos em NPs de ouro obtidas apenas com citrato de sódio. Na Figura 19 é possível perceber picos em aproximadamente 1120 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , 1350 cm^{-1} e 1875 cm^{-1} (representados com um asterisco) para os dois corantes. Tais sinais referem-se ao plasma da radiação excitante em 785 nm e não são atribuídos a nenhuma espécie.

Observam-se algumas diferenças entre os espectros SERS do corante AM em relação ao substrato, na presença e ausência dos ácidos húmicos, como por exemplo, a diminuição da intensidade da banda em 1456 cm^{-1} para as Au/AH e o aumento da intensidade da banda em 1047 cm^{-1} .

Os espectros SERS para AM foram obtidos em com excitação de 785 nm, pois com radiação excitante de 632,8 nm o corante está em condição de ressonância, gerando intensa fluorescência.

Figura 19. Espectros SERS de a) AM e b) eosina Y adsorvidos em nanopartículas Au/AH e citrato em pH 3 e pH 6 e Au/citrato sintetizadas sob refluxo ($\lambda_0 = 785$ nm).

4.1.3 Terceira abordagem: redução por citrato de sódio, e posterior modificação superficial por ácido húmico

Nesta etapa do trabalho, investigamos a possibilidade de modificação superficial de nanopartículas de ouro preparadas por redução em meio à citrato de sódio por ácidos húmicos. Nessa abordagem, os ácidos húmicos são adicionados às nanopartículas após a sua síntese, e a modificação superficial ocorre por troca da camada estabilizante (inicialmente de citrato) pelos ácidos húmicos. A Figura 20 representa os espectros de extinção das NPs com e sem ácido húmico. Observa-se a diminuição da intensidade e deslocamento do máximo de absorção para regiões de maiores comprimentos de onda, ou seja, menor energia, na presença de ácidos húmicos.

Figura 20. Espectros de extinção de NPs de Au/citrato com modificação da superfície através da adição de solução de AH em diferentes concentrações.

O desempenho de tais nanoestruturas como substratos SERS é apresentado a seguir. Inicialmente, são apresentados os espectros SERS apenas para as

nanoestruturas, Figura 21. Nota-se a presença de uma janela espectral sem bandas em todos os casos, caracterizando as amostras como bons substratos SERS-ativos. Percebe-se, também, que à medida que a concentração de ácido húmico diminui, seus espectros ficam semelhantes aos das NPs sintetizadas pelo método citrato.

Figura 21. Espectros SERS das NPs de Au/citrato na ausência e presença de ácido húmico modificando sua superfície, em diferentes concentrações.

A Figura 22 mostra os espectros SERS do AN adsorvido em NPs de ouro preparadas apenas com citrato e em NPs de ouro com modificação da superfície através da adição de solução $0,25 \text{ gL}^{-1}$ de ácido húmico, cujas alíquotas foram centrifugadas em 1500 rpm e 3000 rpm. O tratamento por centrifugação foi realizado a fim de retirar o excesso de moléculas de ácido húmico em suspensão que poderiam impedir a adsorção do corante nas NPs. Observa-se um espectro SERS mais intenso na ausência dos ácidos húmicos. Na sua presença, a banda característica do corante é observada com menor intensidade, e nota-se maior

fluorescência, o que sugere maior dificuldade de adsorção das moléculas do corante, talvez em função da proteção que o ácido húmico gerou na superfície metálica.

Figura 22. Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ adsorvido em NPs de Au/AH sintetizadas sob refluxo em pH 6 com centrifugação em diferentes rotações e utilização do sobrenadante ($\lambda_0 = 632,8$ nm).

Em função da fluorescência ainda presente nos espectros para o AN na presença de ácidos húmicos (Figura 22), decidimos investigar o efeito da diminuição da concentração dos ácidos húmicos utilizados na modificação superficial das nanoestruturas sobre o seu desempenho SERS. Foram investigadas as concentrações de AH entre $2,5 \times 10^{-2}$ gL $^{-1}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ gL $^{-1}$. Os espectros SERS para o AN adsorvido em NPs sintetizadas apenas na presença de citrato e superfície modificada pela adição de AH em diferentes concentrações e pH 6 estão

apresentados na Figura 23. Para efeito de comparação, foi obtido também o espectro SERS para o mesmo corante na ausência de ácidos húmicos. Observa-se uma dependência significativa entre a intensidade do sinal Raman do corante e a concentração dos ácidos húmicos. Nota-se que o melhor desempenho ocorre para a concentração intermediária de AH, ou seja, o sinal mais intenso foi observado para a concentração de $2,5 \times 10^{-3} \text{ gL}^{-1}$. É interessante notar que no menor valor de concentração de AH investigada ($2,5 \times 10^{-4} \text{ gL}^{-1}$) o espectro obtido é bastante parecido com aquele observado na ausência de ácidos húmicos, sugerindo que, nessa concentração, talvez não ocorra a substituição do citrato por ácidos húmicos.

Figura 23. Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ adsorvido em NPs Au sintetizadas sob refluxo com adição de AH pH 6 após a síntese e Au sem AH ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$).

Com o objetivo de descartar a possibilidade de obtenção do sinal mais intenso para a amostra de AH $2,5 \times 10^{-3} \text{ gL}^{-1}$ em função da baixa concentração em

nanopartículas da amostra, foi realizada diluição da amostra de NPs sem AH em cem vezes, para comparação. Os espectros SERS para as suspensões com baixa concentração, na presença e ausência de ácidos húmicos, estão apresentados na Figura 24. É possível observar que ainda assim, a intensidade relativa da banda em 590 cm^{-1} é maior na presença de AH. Estes resultados sugerem maior interação entre as moléculas do corante e as do ácido húmico presentes na superfície metálica.

Figura 24. Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ adsorvido em nanopartículas de Au na ausência e na presença de ácidos húmicos em pH 6, com suspensões diluídas ($\lambda_0 = 632,8\text{ nm}$).

A Figura 25 apresenta os espectros SERS para AN adsorvido em NPs de ouro na ausência e na presença de AH $2,5 \times 10^{-3}\text{ gL}^{-1}$, em uma maior região espectral. A comparação entre os dois espectros mostra uma maior fluorescência na presença de AH, porém não se observam variações significativas das frequências das principais bandas do AN.

Figura 25. Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ em nanopartículas de Au/AH sintetizadas sob refluxo com adição de ácido húmico pH 6 após a síntese e em nanopartículas Au/citrato ($\lambda_0 = 632,8$ nm).

Uma vez obtida uma síntese de NPs Au/AH com bom desempenho como substrato SERS considerando-se como molécula prova o AN, viu-se a necessidade de analisá-la na detecção de outras espécies químicas.

A Figura 26 apresenta os espectros SERS para o azocorante fenazínico verde de Janus (VJ), espécie catiônica, adsorvido em NPs de ouro modificadas pela adição de AH $2,5 \times 10^{-3}$ gL $^{-1}$, bem como o espectro SERS obtido sobre nanopartículas Au/citrato. A comparação dos espectros SERS do VJ na presença e na ausência de ácidos húmicos mostra algumas modificações significativas, causadas pela interação entre o corante e o material orgânico. Tais modificações se refletem no deslocamento de algumas frequências vibracionais, e principalmente em variações de intensidades relativas. Na presença de ácidos húmicos, observa-se a

intensificação relativa das bandas em 1306 cm^{-1} , 1095 cm^{-1} e 1134 cm^{-1} , bem como uma diminuição da intensidade relativa das bandas em 1630 cm^{-1} e 1563 cm^{-1} .

Figura 26. Espectros SERS de nanopartículas de Au modificadas pela adição de AH $2,5 \times 10^{-3}\text{ gL}^{-1}$, e Au/citrato, com [VJ] $1,0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ ($\lambda_0 = 632,8\text{ nm}$). Na parte inferior, fórmula estrutural do corante com destaque para os grupamentos responsáveis pelas freqüências vibracionais indicadas nos espectros.

A Tabela 1 mostra a atribuição vibracional tentativa para o corante VJ (BONANCÊA *et al.*, 2008). Tal atribuição foi baseada em estudos Raman ressonante do corante e na comparação com moléculas de azobenzeno e fenazina, cujas fórmulas estão mostradas na Figura 27. Observa-se que as bandas Raman que sofrem maiores perturbações na presença de ácidos húmicos são atribuídas a

modos vibracionais com contribuições significativas do grupamento azo (-N=N-) do corante. Tais resultados sugerem, assim, uma interação preferencial dos ácidos húmicos com o grupamento azo do VJ.

Figura 27. Fórmulas estruturais do azobenzeno e da fenazina.

Tabela 1 Modos vibracionais (cm^{-1}) observados nos espectros Raman e SERS do VJ (na presença e ausência de ácidos húmicos) e atribuições vibracionais tentativas (BONANCÊA *et al.*, 2008).

Sólido (647,1 nm)	SERS (ausência de ácidos húmicos)	SERS (presença de ácidos húmicos)	Atribuição Tentativa
1631	1630	1630	$\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ (FEN)
1565	1568	1563	$\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ (FEN)
1496	1491	1490	$\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ (FEN)
1470	1469	1466	$\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ (FEN)
1407	1403	1400	$\nu\text{N=N}$ (AZO)
1385	--		$\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ (FEN)
1361	--		$\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ (FEN)
1350	1350	1345	$\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ (FEN)
1308	--	1306	--
1203	1201	1200	$\delta\text{C-H}_{\text{anel}}$ (FEN)
1185	1180	1180	$\delta\text{C-H}_{\text{anel}}$ (FEN))
1134	--	1134	$\nu\text{C1-N}$ (AZO) C1= fenil
1095	1100	1095	$\nu\text{C2-N}$ (AZO) C2= fenazina
683	676	680	$\delta\text{C-H}_{\text{anel}}$ (FEN)
--			$\delta\text{C-H}_{\text{anel}}$ (FEN)
606	606	602	$\delta\text{C-H}_{\text{anel}}$ (FEN)

Com o objetivo de investigar a seletividade das NPs modificadas pela adição de AH, foram obtidos espectros na presença do corante aniônico, eosina Y. Os espectros para eosina são mostrados na Figura 28 e apresentam bastante

fluorescência e fraco sinal para ambos os casos – ausência e presença de AH. Isso pode ser explicado pelo fato de ambos os íons citrato e humato serem ânions e repelirem, assim, as moléculas dos corantes aniônicos.

Figura 28. Espectros SERS de eosina Y $1,0 \mu\text{molL}^{-1}$ adsorvida em nanopartículas de Au sintetizadas sob refluxo com adição de ácido húmico pH 6 após a síntese, e Au/citrato ($\lambda_0 = 785 \text{ nm}$).

4.1.4. Quarta abordagem: uso de ácido húmico sal sódico como agente estabilizante e redutor

Nesta parte de nosso trabalho, investigamos a influência da natureza da substância húmica utilizada na reação de redução do Au^{3+} levando à formação de nanoestruturas de ouro e no processo de modificação superficial e estabilização da nanoestrutura formada. Investigamos nessa quarta abordagem a utilização de ácido húmico sal sódico (AHSS), uma substância húmica também de origem comercial (Aldrich). A Tabela 2 apresenta as composições obtidas por análise elementar das duas substâncias húmicas comerciais utilizadas (ácidos húmicos e ácido húmico sal

sódio), bem como, para efeito de comparação, a composição elementar média de amostras extraídas de solos.

Observa-se significativa diferença entre a composição elementar do ácido húmico utilizado até o presente momento neste trabalho e as composições médias do ácido húmico sal sódico e dos ácidos húmicos extraídos de solos. A porcentagem de matéria orgânica do AH é bastante inferior do que a dos outros ácidos húmicos. Ou seja, uma quantidade significativa de matéria inorgânica encontra-se presente no reagente comercial utilizado. Daí a dificuldade apresentada por esse reagente tanto em reduzir os íons de ouro, quanto em permitir a adsorção das moléculas de corantes estudadas, uma vez que suas propriedades redox estão relacionadas à presença de grupos orgânicos (hidroquinonas e fenólicos).

Tabela 2 Composição elementar média do ácido húmico, ácido húmico sal sódico e ácido húmico extraído de solos (CALDERONI, G.; SCHNITZER, M., 1994).

Ácido húmico Aldrich sal sódico (AHSS)			Ácido húmico Aldrich (AH)			Ácidos húmicos extraídos do solo		
%C	%H	%N	%C	%H	%N	%C	%H	%N
33,85	4,00	0,63	15,90	3,30	0,56	53,8-58,7	3,2-6,2	0,8-4,3

O AHSS, por apresentar maior porcentagem de matéria orgânica, foi mais eficaz na produção de NPs sendo utilizado como agente redutor e estabilizante, se comparado ao ácido húmico inicialmente utilizado. Pode-se evidenciar este fato pela análise dos espectros de extinção apresentados na Figura 29, a qual compara os espectros de extinção de NPs obtidas com AHSS sem controle de pH, cujo valor utilizado foi em torno de 7,5, com NPs obtidas por redução com AHSS e citrato. Observam-se nos espectros as bandas referentes à ressonância do plasmon superficial características de NPs de ouro, tanto na presença quanto na ausência de

citrato de sódio como agente redutor auxiliar. Um ponto importante a ser observado para a síntese envolvendo AHSS é a presença de duas bandas associadas à absorção de plasmon, centradas em 531 e 750 nm. Tais bandas devem-se a nanopartículas de tamanhos e formatos diferentes. A banda na região de maior energia sugere a presença de nanoestruturas esféricas, enquanto a banda na região de menor energia sugere a presença de nanoestruturas anisotrópicas (JAIN *et al.*, 2006; HAO *et al.*, 2004) pela síntese envolvendo AHSS.

Figura 29. Espectros de extinção das nanopartículas Au/AHSS e Au/AHSS com citrato sintetizadas sob refluxo, sem controle de pH do AHSS, o qual foi medido em 7,5.

Com o objetivo de investigar a morfologia dessas NPs, foram obtidas imagens MEV apresentadas na Figura 30. Nota-se a presença de nanopartículas de ouro esféricas com dimensões da ordem de 26 nm (responsáveis pela banda em ca. 530 nm) e triangulares com dimensões da ordem de 65 nm (responsáveis pela banda em 750 nm).

Figura 30. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para NP Au/AHSS obtidas sob refluxo sem controle de pH.

A Figura 31 representa os espectros SERS obtidos para o corante AN adsorvido em NPs Au/AHSS com e sem centrifugação, ora com utilização do

precipitado ora com o sobrenadante. Nota-se um fraco sinal SERS em todos os casos, indicando dificuldade de adsorção das moléculas do corante nessas NPs. Esse fato pode estar relacionado à grande matriz de ácidos húmicos presente em suspensão, mesmo após a centrifugação, dificultando a interação entre corante a nanopartícula.

Figura 31. Espectros SERS para AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ em NPs Au/AHSS sem centrifugar, somente o precipitado redispersado e somente o sobrenadante ($\lambda_0 = 632,8$ nm).

Para continuarmos o estudo da relação entre morfologia, propriedades ópticas e pH do meio, foram obtidas novas NPs de ouro e AHSS sintetizadas em diversos valores de pH, cujo controle deu-se antes e após a mistura reacional. A Figura 32 apresenta os espectros de extinção para essas NPs para o controle antes, nos quais é possível observar a banda característica de nanoestruturas de ouro, embora em pH 10 a banda seja larga e pouco intensa, indicando a presença de nanopartículas de tamanhos diversos, semelhante às imagens MEV obtidas para NPs de Au/AH obtidas na segunda abordagem, Figura 13.

Observa-se, portanto, que quando a reação é executada com controle de pH, inibe-se a formação de nanoestruturas anisotrópicas, e o produto termodinamicamente mais estável (nanoesferas) predomina. De fato, através da variação do pH da reação torna-se possível variar a quantidade de grupos funcionais superficiais envolvidos na reação de redução, alterando, por exemplo, a razão Au^{3+} /grupos redutores, um fator importante no controle do tamanho e da forma das nanopartículas formadas (MURPHY *et al.*, 2005; DANIEL; ASTRUC, 2004).

Interessante observar que o máximo da posição do plasmon superficial desloca-se em direção ao vermelho para menores valores de pH, sugerindo a formação de nanopartículas maiores em meio ácido, de acordo com a teoria de Mie (1908). Tal comportamento pode ser relacionado à dependência da estrutura das substâncias húmicas em relação ao pH do meio (BAIGORRI *et al.*, 2008). Em meio básico, os grupos carboxílicos e fenólicos encontram-se ionizados, resultando em uma conformação mais estendida da macromolécula (CARLETTI *et al.*, 2010), conformação esta que permite que uma maior quantidade de grupos redutores fiquem disponíveis para a reação de redução do ouro.

Conforme o pH diminui, alguns grupos tornam-se protonados e a carga negativa diminui, resultando em uma conformação mais agregada da substância húmica, devido à agregação intra e intermolecular promovida principalmente por interações de hidrogênio. Nesse caso, a adsorção do ouro é favorecida, porém, alguns grupos redutores podem não estar disponíveis para a reação de redução, estando inacessíveis pela conformação mais enovelada da macromolécula. Dessa maneira, em pH mais alto, mais grupos redutores estão disponíveis, resultando em uma reação mais rápida a qual gera nanopartículas menores.

Figura 32. Espectro de extinção de NPs Au/AHSS em diferentes valores de pH controlado antes da mistura reacional.

As nanopartículas produzidas utilizando apenas AHSS como agente redutor e estabilizante apresentaram fraco desempenho como substrato SERS na detecção do corante AN, em todos os valores de pH, mesmo sob radiação excitante de 632,8 nm, como pode ser visto na Figura 33. Tais espectros mostram a banda característica do AN em 590 cm^{-1} com fraca intensidade, e um intenso fundo de fluorescência. Percebe-se ainda que o pior desempenho ocorre para as NPs obtidas em meio básico (pH 10).

Figura 33. Espectros SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ em nanopartículas de Au/AHSS preparadas com controle de pH antes da mistura reacional ($\lambda_0 = 632,8$ nm).

Diante do fraco desempenho das NPs Au/AHSS como substratos SERS, optou-se por adotar alternativas em busca de melhores resultados. Para otimizar o tempo, essas alternativas foram utilizadas em pH 6, uma vez que os melhores resultados foram obtidos nesse pH. A Figura 34 apresenta os espectros de extinção de NPs Au/AHSS obtidas através de diferentes procedimentos de síntese: i) controle de pH antes da mistura reacional, ii) controle de pH após a mistura e ii) utilização de soluções de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e AHSS com concentrações quatro vezes menores, ou seja AHSS $0,25 \text{ g L}^{-1}$ e $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com pH controlado após a mistura. A opção por tentar uma síntese com soluções menos concentradas deu-se por este fato possibilitar a formação de nanoestruturas com formatos diferenciados, devido a maior lentidão do processo. Percebe-se a formação de NPs em todos os casos, com modificações na largura da banda e variações no máximo de extinção. Para a síntese com controle de pH antes da mistura reacional, nota-se um máximo de extinção em maior comprimento de onda (menor energia), característico de estruturas com dimensões maiores.

Figura 34. Espectros de extinção de NPs Au/AHSS obtidas por diferentes métodos de síntese.

Para investigar o desempenho SERS das NPs Au/AHSS, foram obtidos espectros para o corante AN, conforme Figura 35. Os espectros foram obtidos para as NPs com controle de pH após a mistura reacional, em função do melhor resultado nos espectros de extinção, com bandas deslocadas para região de maior energia, indicando nanopartículas em dimensões menores, e da coloração da suspensão coloidal. Sabe-se que suspensões coloidais de NPs de ouro são caracterizadas por coloração avermelhada. O escurecimento da coloração da suspensão sugere formação de agregação do colóide, com obtenção de partículas em dimensões inadequadas para utilização como substratos SERS-ativos. Este fato vai de encontro com os espectros de extinção apresentados na Figura 34. Nota-se, na Figura 35, melhor desempenho para a síntese com soluções diluídas em quatro vezes, embora ainda seja observado um fundo de fluorescência. O fato de a amostra diluída ter apresentado melhor resultado pode ser explicado em função da retirada do excesso

de AHSS na suspensão, o que dificultaria a adsorção do corante sobre a nanoestrutura.

Figura 35. Espectro SERS de AN $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ adsorvido em NPs Au/AHSS com pH 6 controlado após mistura e obtidas em soluções concentradas e diluídas em quatro vezes ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$).

Dado o exposto até o momento, consideramos que o procedimento de síntese otimizado foi obtido para NPs Au/AHSS com controle de pH após a mistura e utilizando-se soluções diluídas. Diante dos melhores resultados obtidos para o corante AN e visando investigar a detecção deste corante em diferentes concentrações, foram então obtidos espectros para o AN, utilizando-se NPs Au/AHSS preparadas com controle de pH após a mistura e obtidas em soluções diluídas, uma vez que estas mostraram-se os melhores substratos SERS-ativos para a quarta abordagem. A Figura 36 apresenta estes espectros, obtidos na faixa de concentrações entre $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Percebe-se um grande fundo de fluorescência na concentração do corante de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (proveniente da solução) e o sinal característico do AN mesmo na concentração de $5,0 \times 10^{-8}$

molL^{-1} , sugerindo a significativa eficiência da técnica SERS na detecção do corante investigado.

Figura 36. Espectro SERS de AN em diferentes concentrações molares adsorvido em NPs Au/AHSS com pH 6 controlado após mistura e obtidas em soluções diluídas em quatro vezes ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$).

Com o objetivo de comparar as intensidades da banda em 590 cm^{-1} nas diferentes concentrações de AN, foi obtido o gráfico apresentado na Figura 37, no qual percebe-se significativa diferença na intensidade da banda observada em concentração do corante de $5,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em relação às demais.

Figura 37. Dependência da intensidade da banda em 590 cm^{-1} em relação às concentrações do corante AN.

Buscando otimizar o desempenho para as NPs Au/AHSS obtidas com controle de pH após a mistura, centrifugou-se 1 mL de sua suspensão coloidal por 10 minutos, com rotação de 10^4 rpm. O sobrenadante, cuja coloração era amarelada (o que sugere uma suspensão de moléculas de AH) foi descartado. Já o precipitado foi redispersado em água até o volume de 2 mL e homogeneizado. Novamente o processo de centrifugação tem o objetivo de remover o excesso de substância húmica não adsorvida às nanopartículas.

Os espectros da Figura 38 mostram o desempenho das NPs Au/AHSS com pH 6 controlado após a mistura, de ambas amostras (concentradas e diluídas), centrifugadas e redispersadas, na presença de AN. Nota-se diminuição do fundo de fluorescência observado na Figura 35 e maior intensificação do sinal, indicando a retirada do excesso de ácidos húmicos que impediam maior interação entre corante e nanopartícula.

Figura 38. Espectro SERS de AN $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ adsorvido em NPs Au/AHSS com controle de pH 6 após mistura e obtido com soluções concentradas e diluídas, ambas com centrifugação e redispersão do precipitado ($\lambda_0 = 632,8$ nm).

A Figura 38 mostra melhor desempenho para as NPs de Au/AHSS com suspensões diluídas, obtendo para o corante AN sinal consideravelmente mais intenso, diante das mesmas condições de análise.

Objetivando a ampliação do estudo, foram obtidos espectros SERS para o corante VJ adsorvido nas NPs Au/AHSS. A Figura 39 apresenta estes espectros, os quais foram obtidos com concentrações do corante em $1,0 \times 10^{-6}$ molL⁻¹ e $1,0 \times 10^{-5}$ molL⁻¹, uma vez que em concentrações menores foram obtidos sinais muito fracos e alta fluorescência.

Figura 39. Espectro SERS de VJ $1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ adsorvido em NPs Au/AHSS com controle de pH 6 após mistura e obtido com soluções concentradas e diluídas, com centrifugação e redispersão ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$).

Novamente os melhores resultados observados na Figura 39, para ambas as concentrações do corante, foram obtidos para a suspensão diluída. Mesmo com VJ $1,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, condição na qual se observa intenso fundo de fluorescência, é possível observar as bandas características do corante.

Para ilustrar as diferenças nos espectros das NPs antes e após a centrifugação de redispersão do precipitado, foram obtidos espectros para o VJ adsorvido em NPs de Au/AHSS obtidas em concentração da suspensão quatro vezes menor que a original, em função dessa amostra apresentar os melhores resultados. A Figura 40 apresenta estes espectros, nos quais nota-se significativa diferença após centrifugação e redispersão do precipitado. Ambos os espectros foram obtidos nas mesmas condições de análise, porém nota-se maior intensificação do sinal e diminuição do fundo de fluorescência para a suspensão após a centrifugação,

sugerindo novamente maior interação entre corante e nanopartícula, em função da retirada do excesso de ácido húmico em suspensão.

Figura 40. Espectros SERS para VJ 10^{-5} molL⁻¹ adsorvido em NPs de Au/AHSS com controle de pH 6 após mistura com soluções diluídas, antes e após centrifugação e redispersão com ($\lambda_0 = 632,8$ nm).

Com o objetivo de investigar o desempenho das NPs de Au/AHSS com controle de pH após a mistura, obtidas com soluções diluídas na detecção de corantes aniônicos, foram investigados espectros na presença dos corantes VC e eosina Y. A Figura 41 apresenta tais espectros, nos quais não é possível observar as bandas características dos analitos.

Figura 41. Espectros SERS para a) VC $1,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$) e b) eosina $1,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ ($\lambda_0 = 785 \text{ nm}$) adsorvidos em NPs Au/AHSS com controle de pH 6 após mistura com soluções diluídas e após centrifugação e redispersão.

A comparação das NPs obtidas nas diferentes abordagens é apresentada na Tabela 3. Diante de tais resultados, conclui-se que as NPs contendo AH apresentam seletividade, interagindo mais facilmente com espécies catiônicas.

Tabela 3. Comportamento comparativo das propriedades das NPs funcionalizadas por ácidos húmicos obtidas através de diferentes abordagens.

	NP	Plasmon Superficial	Morfologia	Desempenho como substratos SERS-ativos				
				Corantes aniônicos		Corantes catiônicos		
				VC	Eosina Y	AN	AM	VJ
Primeira abordagem	Au/AH em pH 1 a 13 estufa	-	-	-	-	-	-	-
	NP	Plasmon Superficial	Morfologia	Desempenho como substratos SERS-ativos				
				Corantes aniônicos		Corantes catiônicos		
				VC	Eosina Y	AN	AM	VJ
Segunda abordagem	Au/AH pH 3 estufa	534 nm	Sem forma definida, da ordem de cerca de 20µm	fraco	-	sim	-	-
	Au/AH pH 6 estufa	535 nm	Entre 20 e 40 nm	não	-	sim	-	-
	Au/AH pH 10 estufa	535 nm	Tipo “árvore”, com dezenas de µm.	não	-	não	-	-
	Au/AH pH 3 refluxo	522 nm	Grandes, mas não muito agregadas.	fraco	não	sim	sim	-
	Au/AH pH 6 refluxo	519 nm	Menores e mais agregadas.	não	não	sim	sim	-
	Au/AH citrato	520 nm	-	não	não	sim	sim	sim
	NP	Plasmon Superficial	Morfologia	Desempenho como substratos SERS-ativos				
				Corantes aniônicos		Corantes catiônicos		
				VC	Eosina Y	AN	AM	VJ
Terceira abordagem	Au/citrato AH 0,25 gL ⁻¹ a 1500 rpm	-	-	-	-	sim	-	-
	Au/citrato AH 0,25 gL ⁻¹ a 3000 rpm	-	-	-	-	sim	-	-
	Au/citrato AH 2,5 × 10 ⁻² gL ⁻¹	527 nm	Entre 20 e 40 nm	-	-	sim	-	-
	Au/citrato AH 2,5 × 10 ⁻³ gL ⁻¹	523 nm	Entre 20 e 40 nm	-	não	sim	-	sim
	Au/citrato AH 2,5 × 10 ⁻⁴ gL ⁻¹	525 nm	Entre 20 e 40 nm	-	-	sim	-	-

	NP	Plasmon Superficial	Morfologia	Desempenho como substratos SERS-ativos				
				Corantes aniônicos		Corantes catiônicos		
				VC	Eosina Y	AN	AM	VJ
Quarta abordagem	Au/AHSS pH 7,5	531 nm e 750 nm	Nanopartículas anisotrópicas da ordem de 26 e 65 nm	-	-	não	-	-
	Au/AHSS pH 3	541 nm	-	-	-	fraco	-	-
	Au/AHSS pH 6	535 nm	Entre 20 e 40 nm	-	-	fraco	-	-
	Au/AHSS pH 10	533 nm	Entre 20 e 40 nm	-	-	fraco	-	-
	Au/AHSS obtidas com suspensão diluída e posterior centrifugação pH 6	538 nm	-	não	não	sim	-	sim

A Tabela 3 apresenta as características das NPs obtidas nas diferentes abordagens. No que se refere ao plasmon superficial, nota-se que nas abordagens 2 (estufa) e 4 são obtidas nanoestruturas maiores, com máximo de absorção em região de menor energia. Para a quarta abordagem também foram obtidas nanoestruturas anisotrópicas, as quais, por serem menos estáveis, não são obtidas com alteração de pH do meio reacional. As abordagens 1 e 2, embora possibilitassem a formação de NPs com bom desempenho SERS na detecção de corantes catiônicos, apresentaram dificuldade de reprodutibilidade, em função do uso da estufa e do fato de o AH utilizado apresentar baixo teor de matéria orgânica, gerando uma grande matriz de ácidos húmicos em suspensão, causando grande fundo de fluorescência nos espectros SERS. Esse fato foi evidenciado nas abordagens 3 e 4, nas quais foi retirado o excesso de AH na suspensão, obtendo-se, assim, intensificação do sinal para outro corante catiônico, o VJ.

Para todas as abordagens notam-se os piores desempenhos como substratos SERS-ativos para as NPs obtidas em pH alto, sugerindo melhor condição de síntese em pH 6.

A Tabela 4 apresenta a comparação do desempenho como substratos SERS-ativos das NPs obtidas em pH 6 na detecção do corante AN, uma vez que para todas as abordagens foram obtidos espectros para este corante. A comparação é realizada em relação à intensidade da banda em 590 cm^{-1} , em contagem.s⁻¹ (cps) e nota-se maior intensificação do sinal SERS para as nanopartículas obtidas a partir de soluções diluídas de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e AHSS (quarta abordagem).

Tabela 4. Comportamento comparativo do desempenho das NPs funcionalizadas por ácidos húmicos obtidas através de diferentes abordagens, como substratos SERS-ativos na detecção do AN $10^{-6}\text{ mol.L}^{-1}$.

	NP	Intensidade da banda (cps)
Segunda abordagem	Au/AH pH 6 estufa	60
	Au/AH pH 6 refluxo	50
Terceira abordagem	Au/citrato AH $0,25\text{ gL}^{-1}$ a 1500 rpm	460
	Au/citrato AH $0,25\text{ gL}^{-1}$ a 3000 rpm	160
	Au/citrato AH $2,5 \times 10^{-2}\text{ gL}^{-1}$	10
	Au/citrato AH $2,5 \times 10^{-3}\text{ gL}^{-1}$	150
	Au/citrato AH $2,5 \times 10^{-4}\text{ gL}^{-1}$	35
Quarta abordagem	Au/AHSS pH 6	15
	Au/AHSS obtidas com suspensão diluída e posterior centrifugação pH 6	625

5. CONCLUSÕES

Este trabalho investiga diferentes metodologias para a preparação de nanopartículas de ouro usando ácidos húmicos, uma fração específica das substâncias húmicas, como agentes redutores e estabilizantes, em diferentes valores de pH. Os ácidos húmicos possuem uma grande capacidade de interação com poluentes orgânicos e inorgânicos, uma vez que possuem um grande número de grupos funcionais em sua estrutura. Além de uma alternativa de síntese de nanopartículas, os resultados deste trabalho demonstram uma relação entre a morfologia das nanopartículas, sua atividade óptica e o pH do meio no qual foram sintetizadas.

Dentre as motivações para o uso dos ácidos húmicos no preparo de nanoestruturas modificadas visando aplicações como substratos SERS para a detecção de poluentes, mencionamos a habilidade das substâncias húmicas em reduzir íons Au^{3+} levando a formação de nanoestruturas plasmônicas e atuar como um *template* polimérico permitindo a estabilização das nanopartículas, bem como afinidade das substâncias húmicas para com diversos poluentes, a qual permite que a modificação superficial atue como uma fase de extração associada ao substrato SERS - favorecendo a interação entre a nanopartícula SERS-ativa e a espécie química de interesse - possibilitando o aumento da sensibilidade da técnica.

A caracterização das nanopartículas de ouro modificadas por ácidos húmicos (NP Au/AH) foi realizada por absorção de plasmon de superfície no UV-Vis, microscopia eletrônica de varredura e por espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS). Um estudo sistemático dos métodos de síntese e da influência do pH nas propriedades ópticas das nanopartículas é apresentado. Tais nanopartículas foram utilizadas como substrato para a detecção de corantes em concentrações da

ordem de micromolar, e o estudo espectroscópico da interação de corantes orgânicos com substâncias húmicas.

Observa-se uma significativa dependência entre a morfologia das nanoestruturas formadas e o pH da reação. De fato, o mecanismo de formação das nanopartículas depende das características das substâncias húmicas, as quais são significativamente dependentes do pH.

Diferentes abordagens foram propostas em busca da melhor síntese, embora em todas obtivemos resultados inferiores no que se refere aos espectros SERS para as NPs obtidas em pH alto e melhores para aquelas obtidas em pH 6.

Inicialmente investigamos a utilização de um ácido húmico comercial (AH) como agente redutor e estabilizante das nanoestruturas, porém observamos dificuldades em reprodutibilidade, em função da grande quantidade de variáveis a serem controladas. Diante disso, a proposta foi unir um método já bastante difundido (método Lee e Meisel), com menos variáveis e condições mais facilmente controláveis, à adição do AH. As NPs obtidas nessa segunda abordagem mostraram-se mais reprodutíveis, embora os espectros SERS para as espécies adsorvidas nessas nanoestruturas ainda apresentassem fluorescência, indicando ainda certa dificuldade de adsorção dos analitos na superfície metálica.

A partir de tais observações, viu-se a necessidade de diminuir o excesso de AH na suspensão, sintetizando as NPs pelo método Lee e Meisel e modificando a camada passivante da NP a partir da adição de AH, em diferentes concentrações. Observou-se, nessa terceira abordagem, significativa intensificação do sinal a partir da adição de uma solução menos concentrada de AH do que a utilizada inicialmente. As propriedades ópticas dessas NPs foram intensificadas a partir da centrifugação e redispersão do precipitado.

O objetivo de obter NPs utilizando apenas um ácido húmico como redutor e estabilizante de forma reprodutível motivou a utilização de outro reagente, o ácido húmico sal sódico (AHSS), também comercial, o qual possui composição elementar bastante diferente do AH, uma vez que seu teor de matéria orgânica é significativamente maior do que a do AH. De fato, nessa quarta abordagem, o AHSS mostrou-se eficiente na síntese e estabilização de NPs de ouro, sendo possível a obtenção de nanoestruturas anisotrópicas.

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, concluímos que a quarta abordagem representa a melhor opção de síntese, uma vez que faz uso apenas do ouro e do AHSS, com menos variáveis a serem controladas e com condições de síntese bastante simples, apresentando-se eficiente na detecção de corantes, especialmente catiônicos, em concentrações da ordem de 10^{-8} molar.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 15, 5215-5217, 1977.

ALVAREZ-PUEBLA, R. A.; SANTOS, D. S.; AROCA, R. F. SERS detection of environmental pollutants in humic acid–gold nanoparticle composite materials. **The Analyst**, [S.I.], v. 132, n. 12, 1210-1214, 2007.

AROCA, R. F. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures. **Advances in Colloid Interface Science**, Windsor, v. 116, 45-61, 2005.

BAIGORRI, R. *et al.* Optical Enhancing Properties of Anisotropic Gold Nanoplates Prepared with Different Fractions of a Natural Humic Substance. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 4, 1516-1521, 2008.

BAUER, M. *et al.* Electron transfer capacities and reaction kinetics of peat dissolved organic matter. **Environmental Science Technology**, Bayreuth, v. 41, n.1, 139-145, 2007.

BONANCÊA, C. E. *et al.* Surface-enhanced Raman study of electrochemical and photocatalytic degradation of the azo dye Janus Green B, **Applied Catalysis B: Environmental**, São Paulo, v. 77, 339–345, 2008.

BROWN, M.A.; DEVITO, S. C. Predicting azo dye toxicity. **Cri. Ver. Env Science Technology**, Washington, 23, 249-324, 1993.

CALDERONI, G.; SCHNITZER, M. Effects of age on the chemical structure of paleosol humic acids and fulvic acids. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Ottawa, v. 48, n. 10, 2045-2051, 1984.

CARLETTI, P. *et al.* Structural characterization of humic-like substances with conventional and surface-enhanced spectroscopic techniques. **Journal of Molecular Structure**, v. 982, 169–175, 2010.

CORIO, P. A contribuição do mecanismo de transferência de carga para o efeito SERS em interfaces eletroquímicas. 1998. 131 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

CRESPILHO, F.N. *et al.* Immobilization of Humic Acid in Nanostructured Layer-by-Layer Films for Sensing Applications. **Environmental Science Technology**, São Carlos, v. 39, n. 14, 5385 – 5389, 2005.

DANIEL, M. C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, 293–346, 2004.

DE SOUZA, S. M. A. G. U; PERUZZO, L. C, DE SOUZA, A. A. U. Numerical study of the adsorption of dyes from textile effluents. **Applied Mathematical Modelling**, Santa Catarina, v.32, n. 9, 1711-1718, 2008.

DEL VECCHIO, R.; BLOUGH, V. N. On the origin of the optical properties of humic substances. **Environmental Science Technology**, College Park, v. 38, n. 14, 3885-3891, 2004.

DOS SANTOS JR., D. S. *et al.* Controlling the size and shape of gold nanoparticles in fulvic acid colloidal solutions and their optical characterization using SERS. **Journal of Materials Chemistry**, Windsor, 2005, 15, 3045–3049.

DUBAS, S. T.; PIMPAN, V. Humic acid assisted synthesis of silver nanoparticles and its application to herbicide detection. **Materials Letters**, Bangkok, v. 62, 2661–2663, 2008.

FARIA, D. L. A., TEMPERINI, M. L. A., SALA, O. Vinte anos de efeito SERS. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 4, 541-552, 1999.

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

FORT, E.; GRÉSILLON, S. Surface enhanced fluorescence. **Journal of Physics D: Applied Physics**, Paris, v. 41, 1-31, 2008.

GUERRERO, A. R.; AROCA, R. F. Surface-Enhanced Fluorescence with shell-isolated nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v.50, n. 3, 665–668, 2011.

HAO, E. *et al.* Synthesis and optical properties of “branched” gold nanocrystals. **Nano Letters**, Evasnton, v. 4, n. 2, 327–330, 2004.

HAO, E.; SCHATZ, G. C. Optical properties of metal nanoshells. **Journal of Physical Chemistry B**, Evanston, v. 108, n. 4, 1224-1229, 2004.

JAIN, P. K. *et al.* Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 14, 7238-7248, 2006.

JEANMAIRE, D. L.; VAN DUYNE, R. P. Surface Raman Spectroelectrochemistry. **J. Electroanal. Chem.**, Evanston, v.84, n. 1, 1-20, 1977.

KELLY, K. *et al.* The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, 668-677, 2003.

KUNZ, A. *et al.* Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, Curitiba, v. 25, n. 1, 78-82, 2002.

LE, F. *et al.* Metallic nanoparticle arrays: a common substrate for both surface-enhanced Raman scattering and Surface-Enhanced Infrared Absorption. **ACS Nano**, v. 2, n. 4, 707–718, 2008.

LEE, P. C.; MEISEL D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, 3391-3395, 1982.

LOMBARDI, J. R. *et al.* Charge-transfer theory of surface enhanced Raman spectroscopy: Herzberg-Teller contributions. **Journal of Physical Chemistry**, v. 84, n. 8, 4172-4180, 1986.

LONG, D. A. The Raman Effect: A unified treatment oh the theory of Raman Scattering by molecules. Chichester: John Wiley & Sons, 2001.

MACHESKY, M. L.; ANDRADE, W. O.; ROSE, A. W. Interactions of gold (III) chloride and elemental gold with peat-derived humic substances. **Chemical Geology**, Champaign, v. 102, 53–71, 1992.

MIE, G. "Beitrage zur Optik tüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen," **Annalen der Physik**, v. 330, n. 3, 377-445, 1908.

MURPHY, C. J. *et al.* Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 29, 13857-13870, 2005.

MURPHY, C. J. *et al.* The many faces of gold nanorods. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 1, n. 19, 2867-2875, 2010.

REBBURN, M.; MEIR, S.; LAOR, Y. Using dissolved humic acid to remove hydrophobic contaminants from water by complexation-flocculation Process. **Environmental Science Technology**, Haifa, v. 32, n. 7, 981–986, 1998.

ROCHA, J.C.; ROSA, A.H. Substâncias húmicas aquáticas – interações com espécies metálicas, São Paulo: UNESP, 2003.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. **Naturwissenschaften**, Wiesbaden, v. 80, n. 1, 29-30, 1993.

SCHWARZENBACH, R. P. *et al.* Quinone and iron porphyrin mediated reduction of nitroaromatic compounds in homogeneous aqueous solution. **Environmental Science Technology**, Zurique, v. 24, n. 10, 1566-1574, 1990.

SENESI, N.; LOFFREDO, E. The chemistry of soil organic matter. In: SPARKS, D. L. *Soil Physical Chemistry*. Boca Raton: CRC Press, 1999. 239–370.

STEVENSON, F.J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions. 2 ed. Nova Iorque: JohnWiley & Sons, 1994.

STRUYK, Z.; SPOSITO, G. Redox properties of standard humic acids. **Geoderma**, v. 102, 329–346, 2001.

SUN, Y.; XIA, Y. Gold and silver nanoparticles: a class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. **Analyst**, v. 128, n. 6, 686-691, 2003.

THOMAS, K.G.; KAMAT, P. V. Chromophore-functionalized gold nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, Trivandrum, v. 36, n. 12, 888-898, 2003.

TIAN Y.; TATSUMA T. Mechanisms and applications of plasmon-induced charge separation at TiO₂ films loaded with gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 20, 7632-7637, 2005.

TIPPING, E. Cation binding by humic substances, Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

VAUTIER, M.; GUILLARD, C.; Herrmann, J. M. Photocatalytic degradation of dyes in water: case study of indigo and of indigo carmine. **Journal of Catalysis**, Lyon, v. 201, 46-59, 2001.

WILEY, B. J. *et al.* Synthesis and optical properties of silver nanobars and nanorice. **Nano Letters**, v. 7, n. 4, 1032-1036, 2007.

WOOD, S. A. The role of humic substances in the transport and fixation of metals of economic interest (Au, Pt, Pd, U, V). **Ore Geology Reviews**, Moscow, v. 11, 1–31, 1996.

XIA, Y.; HALAS, N. J. Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures. **M. R. S. Bulletin**, [S.I.], v. 30, n. 5, 338-348, 2005.

YANG, M. *et al.* SERS-active gold lace nanoshells with built-in hotspots. **Nano Letters**, Vigo, v. 10, n. 10, 4013-4019, 2010.

YATES, J. T.; MADEY, T. E. Vibrational spectroscopy of molecules on surfaces, methods of surface characterization. New York: Eds. Plenum Press, 1987. v. 1.

YATES III, L. M.; VON WANDRUSZKA, R. Decontamination of polluted water by treatment with a crude humic acid blend. **Environmental Science Technology**, Moscow, v. 33, n. 12, 2076–2080, 1999.