



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Desenvolvimento de um método analítico para a detecção de
metanfetamina utilizando Espalhamento Raman Intensificado
por Superfície (SERS)**

MARCO ANTONIO DE SOUZA

2018

Desenvolvimento de um método analítico para a detecção de
metanfetamina utilizando Espalhamento Raman Intensificado por
Superfície (SERS)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Marco Antonio de Souza

Orientador: Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Joel Camargo Rubim

Brasília, DF
2018

-

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Márcio e Ana Lúcia por depositarem em mim a confiança de viver uma boa vida e me ensinarem a dar valor ao conhecimento e ao trabalho. Sempre carregarei vocês no coração.

À minha querida esposa Flavia pela parceria nas discussões dos resultados obtidos, apoio, paciência e carinho durante essa caminhada.

Ao meu cão Nemo, querido e fiel companheiro.

À minha colega de bancada e amiga Karolyne, pelo espírito de grupo e suporte aos experimentos necessários ao projeto.

Ao Professor Joel Rubim, pela humildade e forma com que me recebeu, de braços abertos, em seu laboratório e pelo conhecimento transmitido. Sem palavras.

Ao Professor Luciano Paulino pela oportunidade dada para o desenvolvimento desse projeto, que já perdurava no campo das ideias desde que ingressei na Polícia Federal, há 12 anos atrás.

Aos demais discentes do curso, pela transmissão de conhecimento.

À Polícia Federal pelo apoio e fomento a projetos que impliquem no aprimoramento institucional.

Ao Instituto Nacional de Identificação pelo fomento a projetos que elevam cada vez mais o caráter técnico científica da papiloscopia no Brasil, e, desta forma, ajudam a aprimorar o processo de persecução penal no país.

À Academia Nacional de Polícia pelo suporte e apoio.

Aos meus amigos e familiares pelo incentivo e apoio.

Aos meus colegas do grupo do LNANO – EMBRAPA e LMC – UnB pelo apoio.

Ao mundo por mudar as coisas, por nunca fazê-las serem da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar, o que descobrir e o que fazer.

Um barco está seguro no porto. Mas os barcos não são feitos para isso. (John A. Shedd)

Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes. (Isaac Newton)

RESUMO

Neste trabalho é proposta uma metodologia para a detecção de metanfetamina (MA) utilizando espectroscopia Raman intensificado por superfície (SERS). O SERS também foi utilizado para estudar a adsorção de MA em substratos ativos SERS e verificar a possibilidade de aplicar esta metodologia na detecção de MA em impressões digitais. A estratégia adotada envolveu o uso de substratos SERS ativos de filmes de nanopartículas de prata dispersas em gel de agarose (AgNPs/Agar) depositadas em lâminas de vidro e de alumínio. A MA utilizada para preparar as soluções de trabalho para os estudos SERS foi o sal de cloridrato correspondente. Ela foi analisada por $^1\text{H-RMN}$ e a sua pureza foi determinada como 99,3%. Os filmes AgNPs/Agar foram obtidos com e sem adição de NaCl 0,01 mol/L utilizando citrato como agente redutor. As AgNPs foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e o filme AgNPs/Agar foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis e Raman. O diâmetro médio das AgNPs foi de $13,8 \pm 6,9$ nm e $13,5 \pm 3,6$ nm, para a síntese com NaCl adicionado e nenhum NaCl adicionado, respectivamente. Os resultados de UV-Vis mostraram que a absorção máxima das ressonâncias de plasmon de superfície localizadas (LSPR) para as AgNPs obtidas com NaCl adicionado foi observada a 430,5 nm enquanto na síntese sem adição de NaCl a LSPR mostrou um máximo de 426,5 nm. Ambos os substratos SERS apresentaram um forte sinal SERS em aprox. 240 cm^{-1} , atribuído ao estiramento Ag-Cl. Os resultados de SERS mostraram que o substrato AgNPs / Agar/Al era aquele com uma melhor relação sinal-ruído e a MA foi detectada até 10^{-5} mol/L. Observou-se também que a intensidade SERS da MA variou com a concentração de MA atingindo um valor constante para $[\text{MA}] > 2,0 \times 10^{-4}$ mol/L, sugerindo saturação da superfície. As isotermas de adsorção (θ) vs $[\text{MA}]$ foram obtidas pela expressão I/I_0 (I é intensidade de SERS em qualquer concentração de MA e I_0 é a intensidade de SERS na concentração de MA de saturação de superfície) para a avaliação da cobertura de superfície (θ). Os dados experimentais foram ajustados às isotermas de Langmuir, Frumkin e Freundlich. A análise dos resultados sugeriu que os dados experimentais foram melhor adaptados ao modelo de adsorção de Frumkin. As constantes de adsorção obtidas foram $8,3 \times 10^3$ mol/L e $1,7 \times 10^4$ mol/L, para AgNPs sintetizadas com a adição e sem adição de NaCl, levando a valores de ΔG_{ads} de -22,4 kJ/mol e -24,1 kJ/mol, respectivamente. O substrato AgNPs/Agar/Al também foi utilizado para identificar MA em uma impressão digital contaminada com uma solução 0,01 mol/L da droga. Os espectros de SERS em diferentes locais da impressão mostraram sinais relativamente altos da MA adsorvida, sugerindo que esta metodologia é promissora para ser aplicada na detecção de outras drogas ou outras substâncias de interesse forense.

ABSTRACT

In this work a methodology is proposed for the detection of methamphetamine (MA) using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). SERS was also used to study the adsorption of MA on SERS-active substrates and to verify the possibility of applying this methodology in the detection of MA in fingerprints. The strategy adopted involved the use of SERS-active substrates as films of silver nanoparticles dispersed in agarose gel (AgNPs/Agar) deposited on glass and aluminum slides. The MA used to prepare the working solutions for the SERS studies was the correspondent hydrochloride salt. It was analyzed by $^1\text{H-NMR}$ and its purity was determined as 99.3%. AgNPs/Agar films were obtained with and without the addition of $\text{NaCl } 0.01 \text{ mol.L}^{-1}$ using citrate as reducing agent. The AgNPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and the AgNPs/Agar films were characterized by UV-Vis and Raman spectroscopy. The mean diameter of the AgNPs were $13.8 \pm 6,9 \text{ nm}$ and $13.5 \pm 3,6 \text{ nm}$, for the synthesis with added NaCl and no NaCl added, respectively. The UV-Vis results showed that the maximum absorption of the localized surface plasmon resonances (LSPR) for the AgNPs obtained with added NaCl was observed at 430.5 nm while in the synthesis with no addition of NaCl the LSPR showed a maximum at 426.5 nm. Both SERS substrates presented a strong SERS signal at ca. 240 cm^{-1} , assigned to the Ag-Cl stretching. The SERS results showed that the AgNPs/Agar/Al substrate was the one with better signal-to-noise ratio and MA was detected down to $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. It was also observed that the SERS intensity of MA varies with the MA concentration achieving a constant value for $[\text{MA}] > 2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, suggesting surface saturation. Adsorption isotherms (θ vs $[\text{MA}]$) were obtained by the expression I/I_0 (I is SERS intensity at any MA concentration and I_0 is the SERS intensity at the MA concentration of surface saturation) for the evaluation of the surface coverage (θ). The experimental data were fitted to Langmuir, Frumkin and Freundlich isotherms. The analysis of the fitting results suggested that the experimental data were best fitted to the Frumkin adsorption model. The obtained adsorption constants were $8.3 \times 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$ and $1.7 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$, for AgNPs synthesized with the addition and no addition of NaCl, leading to ΔG_{ads} values of $-22.4 \text{ kJ.mol}^{-1}$ and $-24.1 \text{ kJ.mol}^{-1}$, respectively. The AgNPs/Agar/Al substrate was also used to record a finger print contaminated with a 0.01 mol.L^{-1} MA solution. The SERS spectra of different sites showed relatively high signals of the adsorbed MA, suggesting that this methodology is promising to be applied in the detection of other drugs or other substances of forensic interest.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento da quantidade de ATS apreendido no mundo entre 2009 a 2014. Adaptada de [1].	3
Figura 2. Molécula da β -fenetilamina. Retirada de [10].	9
Figura 3. Representação dos locais de modificações químicas possíveis (R1-R9) na estrutura da molécula de β -fenetilamina resultando em um número ilimitado de substâncias possíveis. Retirada de [10].	9
Figura 4. Estrutura da molécula de MA (a) e cloridrato de MA (b) Retirada de [10].	10
Figura 5. Rotas de síntese de MA partindo da efedrina ou pseudoefedrina como precursores Retirada de [10].	10
Figura 6. Algumas formas de apresentação da MA: comprimidos (a) e cristais (b). Retiradas de (a) [12] e (b) [13].	11
Figura 7. Representação do espectro do visível. Retirada de [31].	23
Figura 8. Representação das transições eletrônicas envolvidas na UV-Vis. Adaptada de [31].	24
Figura 9. Desenho esquemático dos principais componentes de um microscópio eletrônico de transmissão. Adaptada de [43].	25
Figura 10. Efeito do campo magnético externo na diferença de energia entre os estados de spin nuclear. Retirada de [45].	27
Figura 11. Representação esquemática do experimento conduzido por Raman. Retirada de [47].	29
Figura 12. Representação do fenômeno de espalhamento de luz. Retirada de [48].	30
Figura 13. Esquemas dos mecanismos de espalhamento. Adaptada de [39].	31
Figura 14. a) Espectro de absorção UV-vis de um solução de bixina 10^{-5} M (um carotenoide) em CHCl_3 . b) Espectros Raman ressonante da mesma solução de a) para as radiações laser excitantes indicadas. Adaptada de [50].	36
Figura 15. Modelo do complexo de transferência de carga formado pela interação entre a Piridina (Py) e clusters de nanopartículas de prata (Ag). a) complexo de clusters de prata e piridina dispersos em gás inerte; b) complexo cluster de prata e piridina em eletrodo de prata.. E_F , LDS, ρ , representam respectivamente o nível de Fermi da prata, a densidade local de estados, doadores e receptores de cargas. Retirada de [60].	39
Figura 16. Representação esquemática da ralação entre os LDS do metal e os orbitais HOMO e LUMO do adsorbato sob efeito de um potencial aplicado. Retirada de [58].	39
Figura 17. Representação esquemática da oscilação da nuvem eletrônica (plasmon de superfície) de nanopartículas ao serem submetidas a um campo eletromagnético. Adaptada de [61].	40
Figura 18. Representação das imagens de microscopia óptica de varredura de campo próximo para as excitações ópticas sobre o filme de ouro em vidro para diferentes comprimentos de onda. Adaptada de [73].	44
Figura 19. Representação gráfica do processo de captura, imobilização e aproximação de AgNPs. (a) Única partícula imobilizada (I) Nenhum sinal SERS. (b) Processo de aproximação de uma partícula capturada até a partícula imobilizada (T), Nenhum sinal SERS. (c) Introduzido contato de campo próximo ao par de partículas (P) Sinal SERS observado. Retirada de [75].	45

Figura 20. Espectros Raman do filme de CoPcTs irradiado por laser em 632,8. a) lâmina sem recobrimento com filme contendo AgNPs. b) lâmina recoberta com filme contendo AgNPs. Retirada de [38].	47
Figura 21. Representação da molécula de agarose. Retirada de [78].	48
Figura 22. Representação gráfica de uma isoterma de adsorção. Retirada de [85].	54
Figura 23. Tendências das isotermas de adsorção. Retirada de [85].	54
Figura 24. (a) Representação do sistema montado para a rota de síntese de AgNPs em gel de agarose e (b) ampliação da imagem do sistema montado para a reação.	64
Figura 25. Etapas da deposição do filme de agarose em lâminas de alumínio. (a) Imagem da lâmina de alumínio de dimensões 25 × 25 mm. (b) Imagem da formação do filme de AgNPs/Agar/Vidro por <i>spin coating</i> a uma rotação de 1000 RPM. (c) Imagem das lâminas de vidro recobertas com filme de AgNPs/Agar acondicionadas em placas de petri.	65
Figura 26. Gel de agarose preparado sem a adição de AgNO ₃ como controle.	65
Figura 27. Eletromicrografias obtidas por MET das AgNPs(NaCl)/Agar (a) e AgNPs/Agar (c). Os círculos em vermelho destacam alguns agregados de AgNPs. Os histogramas correspondentes são apresentados em (b) e (d).	74
Figura 28. Espectro UV-Vis do filme AgNPs(NaCl)/Ágar/Vidro.	75
Figura 29. Espectro UV/Vis do filme AgNPs/Ágar/Vidro.	75
Figura 30. Espectro de absorção no UV-Vis para amostra de cloridrato de MA 1,0×10 ⁻³ mol/L.	77
Figura 31. RMN ¹ H da amostra de cloridrato de MA, onde são representados os deslocamentos químicos referentes a cada hidrogênio da molécula.	79
Figura 32. Espectro Raman da amostra de cristais de cloridrato de MA.	80
Figura 33. Espectro Raman do substrato AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro. Objetiva 50 X.	81
Figura 34. Espectro SERS de uma solução 1,0×10 ⁻² mol/L de cloridrato de MA depositada (100 µL) sobre AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro. Objetiva 50×.	82
Figura 35. Representação 3D de 100 espectros correspondentes a amostra com concentração de 5,5×10 ⁻³ mol/L de MA.	82
Figura 36. Espectros SERS das lâminas de vidro AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações, objetiva de 20×.	83
Figura 37. Espectros SERS das lâminas de vidro AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações, objetiva de 50×.	84
Figura 38. Espectros Raman da lâmina de vidro recoberta com gel de agarose sem prata, gotejada com solução de cloridrato de MA 1,0×10 ⁻² mol/L.	86
Figura 39. Espectros Raman, obtidos nas datas indicadas, da lâmina AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro. Objetiva de 50×.	87
Figura 40. Espectros SERS das lâminas AgNPs(NaCl)/Agar/Al com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações. Objetiva de 20×.	88
Figura 41. Espectros SERS das lâminas AgNPs(NaCl)/gar/Al com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações. Objetiva de 50×.	88
Figura 42. Espectros SERS das lâminas AgNPs/Agar/Al com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações. Objetiva de 20×.	90
Figura 43. Espectros SERS das lâminas AgNPs/Agar/Al com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações. Objetiva de 50×.	91

Figura 44. Espectros Raman da lâmina de alumínio recoberta com gel de agarose sem prata (a) sem MA; (b) gotejada com solução de cloridrato de MA $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L e (c) Espectro SERS da lâmina de AgNPs/Agar/Al com mesma solução para fins de comparação.	93
Figura 45. Variação da intensidade Raman pela concentração das amostras (a) AgNPs(NaCl)/Agar/Al e (b) AgNPs/Agar/Al.....	95
Figura 46. (a) Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNPs(NaCl)/Agar/Al e (b) Representação linear da isoterma de Langmuir para a MA adsorvida em AgNPs(NaCl)/Agar/Al.....	95
Figura 47. (a) Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNP/Agar/Al. e (b) Representação linear da isoterma de Langmuir para a MA adsorvida em AgNPs/Agar/Al.	96
Figura 48. (a) Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNPs(NaCl)/Agar/Al. (b) Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNP/Agar/Al.....	97
Figura 49. Representação linear da isoterma de Freundlich para a MA adsorvida em AgNPs(NaCl)/Agar/Al.	98
Figura 50. Representação linear da isoterma de Freundlich para a MA adsorvida em AgNPs/Agar/Al.	98
Figura 51. Imagens SERS da amostra AgNPs(NaCl)/Agar/Al contendo MA em concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L: (a) para o sinal SERS em 1001 cm^{-1} e (b) para o sinal SERS em 243 cm^{-1} . 62/100 e 92/100 são espectros individuais nos sítios indicados. Objetiva de $50\times$	100
Figura 52. Imagens SERS da amostra AgNPs(NaCl)/Agar/Al contendo MA em concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L: (a) para o sinal SERS em 1001 cm^{-1} e (b) para o sinal SERS em 243 cm^{-1} . 43/100 e 76/100 são espectros individuais nos sítios indicados. Objetiva de $50\times$	101
Figura 53. Imagem de impressão digital dopada com solução de MA $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L depositada sobre AgNPs/Agar/Al.....	102
Figura 54. Imagens Raman da amostra de MA obtida de impressão digital depositada sobre a lâmina AgNPs/Agar/Al. (a) para o sinal SERS em 1001 cm^{-1} e (b) para o sinal SERS em 243 cm^{-1} . 66/100, 95/100 e 20/100 são espectros individuais nos sítios indicados. Objetiva de $50\times$	103
Figura 55. Espectros SERS de MA obtida de impressão digital depositada sobre a lâmina AgNPs/Agar/Al. (a) antes da revelação com pó revelador e (b) após a revelação com pó revelador. Cada espectro corresponde a média de 100 espectros individuais. Objetiva de $50\times$	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes colorimétricos para as principais drogas de abuso (Adaptado de [8] [9])	5
Tabela 2. Testes recomendados pelo Documento INJ n° 0604.01 [9]	6
Tabela 3. Distribuição de testes definitivos em categorias (Adaptado de [8])	7
Tabela 4. Solubilidade da MA base e seu sal em diferentes solventes (Adaptado de [10]).....	11
Tabela 5. Constituição química das secreções encontradas nas impressões digitais (Adaptada de [22])	16
Tabela 6. Representação da relação da quantidade de massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente e tendências das isotermas (Adaptada de [87]).....	55
Tabela 7. Descrição das concentrações das amostras utilizadas para as lâminas de vidro	66
Tabela 8. Descrição das concentrações das amostras utilizadas para as lâminas de alumínio	66
Tabela 9. Resultados obtidos por RMN ¹ H da amostra de MA.....	77
Tabela 10. Sinais Raman observados no espectro da MA e atribuições vibracional tentativa.....	80
Tabela 11. Constantes de adsorção e demais parâmetros das isotermas para o sistema AgNPs(NaCl)/Agar/Al.....	99
Tabela 12. Constantes de adsorção e demais parâmetros das isotermas para o sistema AgNPs/Agar/Al	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Agar/Al - Lâminas de alumínio contendo substrato de gel de agarose sem nanopartículas de prata

Agar/Vidro - Lâminas de vidro contendo substrato de gel de agarose sem nanopartículas de prata

AgNPs - Nanopartículas de prata

AgNPs(NaCl)/Agar - Substrato de gel de agarose com nanopartículas de prata sintetizadas na presença de NaCl

AgNPs(NaCl)/Agar/Al - Lâminas de alumínio contendo substrato de gel de agarose com nanopartículas de prata sintetizadas na presença de NaCl

AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro - Lâminas de vidro contendo substrato de gel de agarose com nanopartículas de prata sintetizadas na presença de NaCl

AgNPs/Agar - Substrato de gel de agarose com nanopartículas de prata sintetizadas na ausência de NaCl

AgNPs/Agar/Vidro - Lâminas de vidro contendo substrato de gel de agarose com nanopartículas de prata sintetizadas na ausência de NaCl

AgNPs/Agar/Vidro- Lâminas de alumínio contendo substrato de gel de agarose com nanopartículas de prata sintetizadas na ausência de NaCl

CG-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a um espectrômetro de massa

EPA - Agência de proteção ambiental americana

FT - Raman - Espectroscopia Raman com transformada de Fourier

IFGR - Grupo de Pesquisa Internacional de Impressão Digital

LOD – Limite de detecção

MA - Metanfetamina

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

NIJ - Instituto Nacional de Justiça Americana

ONU - Organizações das Nações Unidas

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SWGDrug - Grupo de Trabalho Científico para Análise de Drogas

UNODC - Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes

UV/Vis- Espectroscopia no Ultravioleta Visível

h = constante de Planck

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Características da MA.....	8
1.2 Controle e identificação da MA.....	12
1.3 Identificação de substâncias químicas em impressões digitais ...	15
1.4 Justificativa	18
1.5 Objetivos.....	20
1.5.1 Objetivo Geral	20
1.5.2 Objetivos Específicos	21
2. Fundamentação Teórica.....	22
2.1 Métodos de Caracterização.....	22
2.1.1 Espectroscopia de Absorção Molecular no Ultravioleta/Visível – UV-Vis.....	22
2.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	24
2.1.3 Ressonância Magnética Nuclear.....	26
2.1.4 Espalhamento Raman	28
2.2 Efeito SERS.....	36
2.2.1 Hot Spots.....	43
2.2.2 Aplicações do efeito SERS	46
2.3 Substratos SERS ativos	47
2.3.1 Agarose	47
2.3.2 Nucleação e Crescimento de AgNPs em Gel de Agarose	49
2.4 A Escolha da AgNPs e do laser em 632,8 nm	49
2.5 Adsorção.....	51
2.5.1 A intensidade do processo de adsorção.....	52
2.5.2 Fatores que influenciam o processo de adsorção.....	52
2.6 Isotermas de adsorção	53
2.6.1 Isoterma de Langmuir	55
2.6.2 Isoterma de Frumkin	57
2.6.3 Isoterma de Freundlich	57
3. Metodologia	59
3.1 Reagentes Químicos Utilizados.....	62
3.2 Procedimento de limpeza de vidrarias.....	62
3.3 Síntese dos substratos SERS ativos	62
3.4 Formação dos filmes dos substratos SERS ativos	64
3.5 Preparação das amostras	66
3.6 Revelação da impressão digital.....	68
3.7 Instrumentação.....	68
3.8 Preparação das amostras para caracterização.....	70
3.8.1 Substratos SERS ativos.....	70
3.8.2 Metanfetamina.....	70
3.9 Acompanhamento dos sítios SERS-ativos ao longo do tempo.....	71
3.10 Softwares utilizados	71
4. Resultados e discussão	73
4.1 Caracterização dos substratos SERS ativos.....	73
4.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	73
4.1.2 UV-Vis	74
4.2 Caracterização da MA.....	76
4.2.1 UV-Vis	76
4.2.2 RMN ¹ H da MA.....	77

4.2.3	Espectro Raman da MA.....	80
4.3	Medidas Raman do substrato SERS na lâmina de vidro para detecção de MA.....	81
4.3.1	AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro.....	81
4.3.2	AgNPs/Agar/Vidro.....	85
4.3.3	Agar/Vidro.....	85
4.3.4	Estabilidade do filme de AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro.....	86
4.4	Medidas Raman do substrato SERS na lâmina de alumínio para detecção de MA.....	87
4.4.1	AgNPs(NaCl)/Agar/Al.....	87
4.4.2	AgNPs/Agar/Al.....	90
4.4.3	Agar/Al.....	93
4.5	Estudo da adsorção da MA nos substratos SERS ativo AgNPs(NaCl)/Agar/Al e AgNPs/Agar/Al.....	94
4.5.1	Isotermas de Langmuir.....	95
4.5.2	Isotermas de Frumkin.....	97
4.5.3	Isotermas de Freundlich.....	97
4.6	Impressão digital.....	101
4.6.1	Mapeamento (<i>Mapping</i>).....	102
5.	Conclusão.....	105
6.	Bibliografia.....	109

1. Introdução

A Comissão do Ópio de Xangai, realizada em 1909, marcou o início das discussões acerca do controle internacional sobre narcóticos e substâncias psicotrópicas, motivado pelo elevado consumo de ópio, substância extraída da papoula. As consequências nocivas dessa substância para a saúde fizeram com que diversos países se reunissem, pela primeira vez, para discutir o problema das drogas e buscar soluções [1].

O controle passou a ser mais rígido, em especial após a 1ª Guerra Mundial, sob a coordenação da Liga das Nações. Com isso observou-se uma diminuição em cerca de 70% da produção de ópio no mundo em 100 anos. É importante destacar que, caso esse controle não fosse realizado e, conseqüentemente, o aumento do consumo do ópio acompanhasse o crescimento natural da população mundial, o consumo atual poderia estar até 13 vezes maior do que o verificado atualmente [1]. Entretanto, outras substâncias surgiram desde então e ampliaram o escopo dos desafios relacionados ao consumo de drogas.

Assim, para melhorar o controle das drogas, considerando sua diversificação, foram assinadas três convenções, no âmbito da Organização das Nações Unidas (ONU), que são utilizadas como a referência legal para seus signatários [2]:

- i. Convenção Única sobre Entorpecentes, 1961 (emendada em 1972);
- ii. Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas, 1971; e
- iii. Convenção Contra o Tráfico Ilícito de Entorpecentes e Substâncias Psicotrópicas, 1988.

As primeiras convenções (*i* e *ii*) tiveram como objetivo sistematizar as medidas de controle internacional. A última (*iii*) teve como foco propor medidas contra o tráfico de drogas, lavagem de dinheiro e controle de percussores químicos [2]. O Brasil é um dos países signatários destas convenções e, portanto, a legislação nacional vigente está em harmonia com as orientações da ONU.

Os últimos relatórios da ONU mostram que o consumo de drogas ilícitas, consideradas tradicionais, como a maconha e a cocaína, atingiram um estado estacionário, enquanto o consumo de drogas sintéticas tem aumentado, entrando para a lista de preocupações das autoridades públicas que lidam com o problema [1] [3]. Além disso, as drogas sintéticas não são controladas ou rastreáveis adequadamente pelo sistema internacional de combate às drogas. Assim, elaborar laudos periciais de constatação, baseados em reagentes convencionais, torna-se uma tarefa muito difícil [4] [5].

As orientações utilizadas para a realização dos exames periciais, tomadas de conclusões e elaboração do laudo são evocadas de organismos e literatura internacional, além de publicações especializadas. Como exemplo cita-se o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC), a DEA-USA (*Drug Enforcement Administration* - Órgão do Departamento de Justiça dos Estados Unidos) que divide responsabilidades com o *Federal Bureau of Investigation* (FBI-USA) em investigar o narcotráfico e o Grupo de Trabalho Científico para Análise de Drogas Apreendidas (SWGDRUG), que é composto por cientistas forenses que colaboram estabelecendo melhores práticas de análises [2] [6] [7].

No período compreendido entre 2009 e 2014, houve um aumento na quantidade de estimulantes do tipo *amphetamine-type stimulants* – ATS apreendidos em todo mundo, em especial anfetamina, metanfetamina (MA) e substâncias do grupo *ecstasy* (3,4-metilenodioximetanfetamina - MDMA, 3,4-metilenodioxianfetamina - MDA, 3,4-metilenodioxietilanfetamina - MDEA, etc.), conforme pode ser observado na Figura 1 [1].

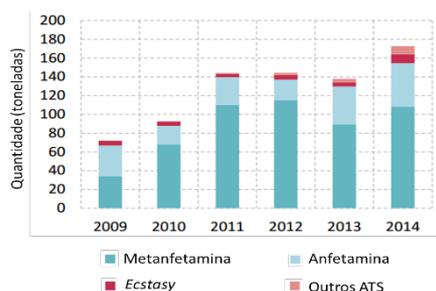


Figura 1. Crescimento da quantidade de ATS apreendido no mundo entre 2009 a 2014. Adaptada de [1].

Nesse cenário, as apreensões de MA representaram a maior parte das apreensões globais anuais de ATS, conforme pode ser constatado pela Figura 1. Por este motivo, esta foi a droga escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho.

De acordo com dados do DEA, na década de 1960, nos EUA, os produtos farmacêuticos contendo MA estavam disponíveis e eram utilizados de forma altamente abusiva. Inicialmente, esta droga foi comercializada como um descongestionante nasal, sendo posteriormente prescrita para depressão, mal de Parkinson, epilepsia, hiperatividade infantil, obesidade, narcolepsia, impotência, e posteriormente ganhando destaque como inibidora de apetite e para aumentar a capacidade física e intelectual [1]. Na década de 1970, devido ao uso abusivo, essa substância passou a ser controlada, provocando redução expressiva de sua utilização. Porém, ainda que proibida sua produção e

comercialização, continuou sendo produzida em laboratórios clandestinos, e com isso, nos anos 1980, foi constatado o uso abusivo dessa substância. Atualmente, a MA é considerada uma droga com grande potencial para utilização abusiva e continua a dominar o mercado (ATS) na América do Norte, Ásia Oriental e Sudeste e Oceania [2]. O UNODC estima que no mundo existam 35,7 milhões de usuários de anfetamina e MA [1].

A variedade de novos produtos psicotrópicos sintéticos produzidos a cada dia, somados à precariedade do processo produtivo dessas drogas, que ocasiona a presença de substâncias interferentes e contaminantes, podem gerar resultados falsos positivos ou negativos para os testes colorimétricos disponíveis para rotina (por exemplo: Teste de Scott, Teste de Wagner (iodo/iodeto) e nitrato de prata, teste de odor pela hidrólise ácida, etc.) [4] [5]. A Tabela 1 resume os principais testes de cor preliminares, segundo orientação da UNODC [2]:

Tabela 1. Testes colorimétricos para as principais drogas de abuso (Adaptado de [8] [9])

Droga ou grupo de drogas	Teste	Resultado	Interferente(s)	Falso(s) positivo(s)
Cocaína	Scott modificado	Cor azul indica a presença de cocaína	Compostos metálicos, p. ex. sais de ferro	Heroína, metadona, lidocaína, dentre outros Patchouli e alguns óleos essenciais (kit comercial DL)
Maconha e Derivados	Fast Blue	Cor avermelhada indica canabinoides	Idade da amostra	Patchouli e alguns óleos essenciais (kit comercial DL)
	Duquenois Levine (DL)	Violeta na camada inferior (clorofórmica) indica presença de canabinoides	Idade da amostra	Patchouli e alguns óleos essenciais (kit comercial DL)
MDMA/MDA	Simon	Cor azul escuro intenso indica MDMA	Substâncias usadas como adulterantes	Certos medicamentos podem reagir similarmente
	Marquis	Cor negra ou púrpura indica MDMA ou MDA Cor laranja que tende para marro indica presença de anfetaminas ou metanfetaminas	Não identificados	Não identificados
Anfetaminas / Metanfetaminas	Marquis	Cor azul escuro	Não identificados	Não identificados
	Simon	Cor azul escuro	Não identificados	Não identificados
Ópio / Morfina / Codeína / Heroína	Marquis	Cor violeta a purpura-avermelhada indica presença de opiáceos Cor violeta que aparece após alguns minutos indica presença de LSD	Não identificados	Não identificados
LSD	Ehrlich	Cor púrpura avermelhada ou rosa indica a presença de benzodiazepínicos Cor púrpura avermelhada indica a presença de barbitúricos	Não identificados	Diidro-LSD
Benzoazepínicos	Zimmerman	Ao queimar produz uma chama verde	Não identificados	Não identificados
Barbitúricos	Dille-Koppanyi	Resíduo da chama produz sólido branco floculento, indicativo para cloretos	Não identificados	Alguns alquil organoclorados podem se comportar da mesma forma Alguns alquil organoclorados podem se comportar da mesma forma
Cloreto de Etila (lança-perfume)	Teste de chama		Não identificados	
	Teste para cloretos		Não identificados	

O escritório de ciência e tecnologia do Instituto Nacional de Justiça, que pertence ao Departamento de Justiça norte americano, desenvolve o Programa de Padrões e Testes de Cumprimento da Lei e Correções, que tem como objetivo dar suporte às agências do sistema de justiça daquele país no que tange a padronização de procedimentos e resultados relacionados à investigação criminal. Neste contexto, o aludido Órgão elaborou um documento padronizador nº 0604.01 para utilização de reagentes de teste de cor / kits para identificação preliminar de drogas de abuso, onde podem ser observados resultados dos testes preliminares com MA, sua positividade, falsos positivos, limite de detecção e relaciona substâncias que resultam em cores próximas ou a mesma cor após a realização dos testes, segundo demonstra a Tabela 2 [9].

Tabela 2. Testes recomendados pelo Documento INJ nº 0604.01 [9]

Teste	Solvente utilizado para a realização do teste	Cor	Limite de detecção – LOD (µg)	Substâncias que resultam na mesma cor ou próxima após a realização dos testes
Medelin	CHCl ₃	Verde amarelado escuro	100	Oxicodona, Quinina
Marquis	CHCl ₃	Laranja avermelhada	5	Anfetamina
Simon	CHCl ₃	Azul escuro	10	MDMA

O aumento na diversidade de substâncias ilícitas utilizadas torna necessário o aprimoramento e o desenvolvimento de metodologias mais rápidas, precisas e específicas para identificação e análise.

Ainda como medida de controle, devido ao caráter internacional do tráfico de drogas, a realização de intercâmbio de dados entre as autoridades responsáveis em nível nacional, regional e internacional torna-se fundamental. Neste sentido, o UNODC elaborou um programa de harmonização e estabelecimento de métodos recomendados de testes para laboratórios nacionais de teste de drogas. Há ainda um Exercício Colaborativo Internacional

- ICE, onde são fornecidas amostras para análise e identificação e os resultados obtidos pelos laboratórios são comparados [2].

Os manuais elaborados a partir deste programa auxiliam na seleção de métodos apropriados para a amostra em exame, deixando espaço também para adaptação, quando necessária. As escolhas da metodologia e da abordagem da sua análise dependem do tipo de droga, da disponibilidade de instrumentação e de materiais adequados, bem como dos requisitos da legislação no local. Embora reconheçam a necessidade de adaptação, as boas práticas de laboratório (BPL) exigem a determinação de pelo menos dois parâmetros não correlacionados. Sugere-se o uso de técnicas analíticas, como por exemplo: testes de cor, cromatografias e espectroscopias. Após a confirmação da identidade de uma determinada substância como sendo ilícita por meio de testes preliminares, é necessária a confirmação deste resultado por meio de metodologias analíticas mais acuradas. A abordagem realizada pela SWGDRUG, organismo que trabalha para aprimorar a qualidade do exame forense de drogas, apoiando o desenvolvimento de padrões mínimos internacionalmente aceitos, distribui os exames conforme suas capacidades de determinação, como pode ser observado na Tabela 3 [7].

Tabela 3. Distribuição de testes definitivos em categorias (Adaptado de [8])

Categoria A	Categoria B	Categoria C
Infravermelho	Eletroforese Capilar	Testes de cor e precipitação
Espectrometria de Massa	Cromatografia Gasosa	Espectroscopia de Fluorescência
Ressonância Magnética Nuclear	Espectrometria de Mobilidade de Íons	Imunoensaios
Espectroscopia Raman	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	Propriedades Físicas e Físico Químicas
Difratometria de Raios X	Microcristalização	Espectroscopia Ultravioleta-Visível
	Marcadores farmacológicos	
	Cromatografia de Camada Delgada	
	Apenas Cannabis: Exame botânico morfológico	

Desta forma, ainda segundo a SWGDRUG, uma validação por meio de qualquer metodologia contida na categoria A, deve ser cancelada refazendo o teste por outra metodologia contida em qualquer categoria (A, B ou C). Se forem utilizadas metodologias das categorias B ou C, deverão ser realizados três testes, sendo ao menos dois deles da categoria B [8].

Considerando o escopo deste projeto, utilizou-se como referência, o manual *Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and their Ring-Substituted Analogues in Seized Materials*, elaborado pela UNODC, que contém as metodologias a serem utilizadas em testes de drogas, com foco em estimulantes de tipo anfetamínico [amphetamine-type stimulants (ATS)], pelos laboratórios parceiros da Instituição [2].

1.1 Características da MA

Os estimulantes do tipo anfetamina (ATS) constituem um grupo de substâncias sintéticas, derivadas da β -fenetilamina (Figura 2). São estimulantes do sistema nervoso central (SNC) e provocam alterações das capacidades físicas e psíquicas, incluindo: aumento do estado de alerta e euforia, aumento da frequência cardíaca, alterações na pressão arterial, mudanças na respiração e temperatura corporal, agitação, tremores, hipertensão, perda de memória, alucinações, mudanças na função e estrutura cerebral, delírios e comportamento violento, que podem variar, a depender da quantidade utilizada, podendo levar à óbito. São acessíveis e fáceis de produzir e encontrados em uma variedade de preparações (pó, comprimidos ou cápsulas), podendo ser injetados, ingeridos oralmente, aspirados ou fumados [3]. Outra preocupação refere-se ao

surgimento de novas drogas estimulantes, como a mefedrona ou a methylenedioxypropylamphetamine (MDPV), também derivadas da β -fenetilamina [10].

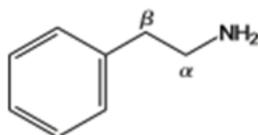


Figura 2. Molécula da β -fenetilamina. Retirada de [10].

Modificações químicas na estrutura da β -fenetilamina (R1 a R9) resultam em diferentes compostos e são normalmente divididas em três grupos, conforme Figura 3:

- (a) Sem substituição no anel aromático (anfetamina, MA, fenetilina);
- (b) Substituição metilenodioxi no anel aromático (MDA, MDMA, MBDB);
- (c) Outros padrões de substituição, incluindo geralmente um ou mais grupos alquiloxi (por exemplo, 2C-B e STP / DOM).

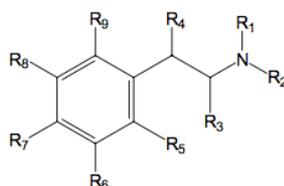


Figura 3. Representação dos locais de modificações químicas possíveis (R1-R9) na estrutura da molécula de β -fenetilamina resultando em um número ilimitado de substâncias possíveis. Retirada de [10].

Dentre os derivados da β -fenetilamina, encontra-se a MA (Figura 4), fármaco mais potente que a anfetamina e facilmente sintetizado em laboratórios clandestinos, devido à facilidade para aquisição dos reagentes necessários. A MA também é conhecida como *speed*, *crystal*, *crank*, *meth*, *go*, *yaba* e *ice*. O cloridrato de MA pode ser utilizado por via oral, injeção intravenosa e ou por via intranasal [11]. Sua rota sintética envolve substâncias de fácil acesso que podem ser encontradas em farmácias (Figura 5). Geralmente é encontrada na forma de

cloridrato, por ser uma composição mais estável. O pKa da MA é igual a 9,87. Em pH 7, 99,9% da MA está na forma protonada. O uso da MA preocupa, em especial, quando utilizada na sua forma básica, por via inalatória, por apresentar maior ação e ter os efeitos mais prolongados [4].

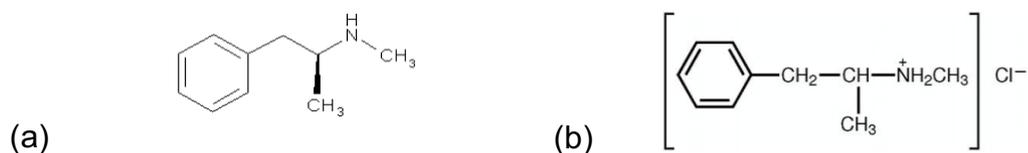


Figura 4. Estrutura da molécula de MA (a) e cloridrato de MA (b) Retirada de [10].

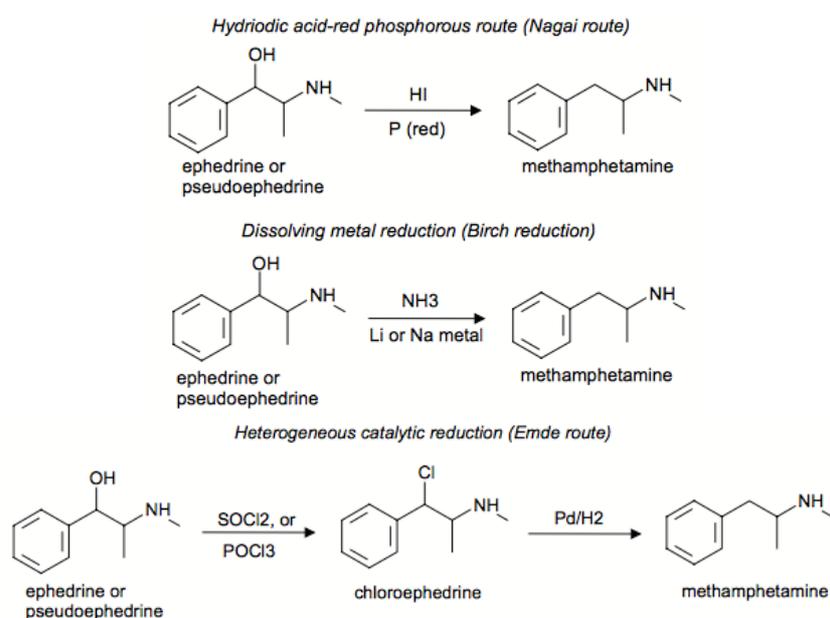


Figura 5. Rotas de síntese de MA partindo da efedrina ou pseudoefedrina como precursores Retirada de [10].

A aparência da MA varia conforme o uso. Na Figura 6 é possível observar as formas mais comuns de apresentação deste psicotrópico. Os comprimidos são para ingestão oral e os cristais são comumente utilizados pelas vias respiratórias.



Figura 6. Algumas formas de apresentação da MA: comprimidos (a) e cristais (b). Retiradas de (a) [12] e (b) [13].

O ponto de fusão da MA na sua forma de cloridrato é entre 170 e 175°C. Quanto à sua polaridade, tanto na forma de sal de cloridrato de MA ou iônica em solução, a molécula de MA possui momento dipolo diferente de zero, sendo portanto polar. Essa propriedade, relevante quando se trata de adsorção, tema que será discutido neste trabalho, pode ser bem entendida para moléculas orgânicas, considerando os momentos de dipolo de suas ligações químicas como vetores apontados para o elemento de maior eletronegatividade. Caso o resultado da somatória desses vetores resulte em 0 (zero), é dito que a molécula é apolar. Caso contrário, polar [14].

O conhecimento acerca das propriedades físicas desta droga permite entender porque também são misturadas a outras substâncias para potencializar seus efeitos, conforme demonstra a Tabela 4.

Tabela 4. Solubilidade da MA base e seu sal em diferentes solventes (Adaptado de [10])

	Metanfetamina e seu sal	
	Base	Cloridrato
Água	Levemente solúvel	Solúvel
Metanol ou etanol	Solúvel	Solúvel
Eter dietílico	Solúvel	Insolúvel
Clorofórmio	Solúvel	Solúvel

1.2 Controle e identificação da MA

Nos últimos anos, o crescimento no abuso e na disseminação mundial das drogas está associado a diversos problemas sociais, em especial aqueles relacionados à segurança pública. No intuito de identificar estas substâncias e coibir o uso, muitos estudos recentes vêm sendo realizados e novas metodologias vêm sendo desenvolvidas de modo a fornecer respostas rápidas e precisas, uma vez que os testes convencionais de confirmação, ou conclusivos, são normalmente realizados em laboratórios analíticos.

Hoje, com o aprimoramento dos equipamentos (sensores, lasers, espectrômetros, lentes, etc.) e softwares/bancos de dados utilizados para caracterização molecular, é possível detectar e identificar traços de substâncias em concentrações muito baixas (*single molecule detection – SMD*) e realizar alguns exames periciais *in loco*, com o advento da portabilização de equipamentos de bancada.

Wen e colaboradores estudaram a aplicação de sensores fluorescentes com alta sensibilidade, seletividade e resposta rápida para detecção e rastreamento da MA. Os autores afirmaram ter criado um método simples, sensível e seletivo para a detecção de vestígios de vapor de MA. Entre eles, o polímero com benzotiadiazol mostrou a melhor seletividade e sensibilidade ao vapor de MA com um limite de detecção de 180 ppb [15].

Andreou e colaboradores desenvolveram um dispositivo microfluídico para detecção dos vestígios de drogas na saliva em poucos minutos. Este dispositivo foi baseado em espectroscopia Raman e no efeito SERS (*Surface Enhancement Raman Spectroscopy*), sendo utilizado para constatar a presença de MA. O uso deste dispositivo apresentou como vantagem permitir o controle

da agregação das nanopartículas de prata (AgNPs) utilizadas para acentuar o sinal e proporcionando uma região confiável com sinal SERS máximo. Foi utilizada abordagem estatística baseada em análise de componentes principais (PCA) como ferramenta para classificação automatizada [16].

Uma nova estratégia para a detecção de mefedrona utilizando efeito SERS em um sistema Raman portátil foi avaliada por Mabbott e colaboradores [17]. Os autores utilizaram experimentos fatoriais fracionários e chegaram a um número de experimentos estatisticamente significativo (288), consideravelmente menor do que o número total de experimentos (1722), minimizando assim a carga de trabalho e mantendo a integridade estatística dos resultados. Para este trabalho os autores utilizaram nanopartículas de ouro e também de prata, variaram o pH e os agentes agregadores (sais). Assim, observou-se a influência de cada variável e foram selecionados quatro protocolos SERS otimizados, para os quais foi estabelecida a reprodutibilidade do sinal SERS e o limite de detecção (LOD) da mefedrona. Utilizando nanopartículas de prata com KNO_3 e pH 7, demonstrou-se que o desvio padrão relativo dos sinais Raman específicos da mefedrona foi de 0,51%, e o LOD foi estimado em cerca de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ (equivalente a $9,06 \times 10^{-6}$ mol/L).

Choodum e colaboradores estudaram o teste de cor Simon, em combinação com uma câmera digital embutida em um telefone celular, para detectar MA. Os dados das cores básicas Vermelho-Verde-Azul (RGB), em tempo real, foram obtidos a partir de um aplicativo instalado no celular e do perfil de relacionamento entre intensidade RGB, incluindo outros valores calculados. Observou-se baixo limite de detecção (entre $0,0110 \pm 0,0001$ e $0,044 \pm 0,002$ mg mL^{-1}) e a possibilidade de utilização de pequenos volumes de amostra ~ 20 μL .

Os resultados obtidos a partir da análise de comprimidos de MA foram comparáveis aos valores obtidos a partir da análise por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID) [18].

Han e colaboradores elaboraram um kit portátil para a detecção rápida e confiável de anfetamina e derivados em urina humana. Este kit contém dois tubos de reagentes, um pacote de substratos padronizados para SERS e um dispositivo miniaturizado Raman portátil. Foi desenvolvido um tratamento prévio de 3 min para separar anfetaminas de urina humana com uma taxa de extração > 80% [19]. O autor afirma que o desempenho excelente do kit portátil aponta para uma grande perspectiva para o desenvolvimento de um protocolo de identificação rápido e confiável *in loco*, especialmente para a segurança pública e saúde.

Uma metodologia para aprimorar a investigação de crimes relacionados à utilização de estimulantes que violam a lei japonesa e que exige a identificação e diferenciação do medicamento utilizado (principalmente drogas estimulantes como a MA) foi proposta por Irii e colaboradores, desenvolvida para a determinação simultânea da tipagem de DNA e detecção de MA, utilizando uma mesma amostra, baseada em Kits de DNA e CG-MS, respectivamente. Os autores afirmam que o método pode ser realizado em aproximadamente 2 h [20].

Lad e colaboradores, em seu artigo de revisão, destacaram a importância da análise de drogas como ramo da química analítica moderna e suas implicações legais e socialmente relevantes em investigações forenses. Neste trabalho, os autores apontam o uso de nanodispositivos como ferramentas eficientes neste campo, com vantagens relacionadas à sensibilidade,

seletividade, facilidade de funcionamento, acessibilidade e capacidade de miniaturização [21].

1.3 Identificação de substâncias químicas em impressões digitais

Pesquisas relacionadas à identificação de substâncias químicas em impressões digitais utilizando a espectroscopia Raman vêm sendo realizadas desde a primeira década deste século. As impressões digitais são muito utilizadas como evidências para individualizar alguém, ainda que existam diferentes formas de fazê-lo por outros tipos de biometria e por DNA, técnica que evoluiu muito nos últimos anos [22].

É sabido que já na antiga Babilônia, há quase 4000 anos, contratos eram celebrados utilizando o desenho dos dedos como assinatura [23]. Hoje, a impressão digital é utilizada rotineiramente, tanto para identificação civil como criminal.

Uma vez que neste trabalho também será explorada a aplicação das impressões digitais na área forense, faz-se necessário entender um pouco de sua composição química, que se apresenta como uma mistura de secreções (suor e gordura) com substâncias advindas do meio externo. A gordura encontrada com frequência nas impressões digitais é oriunda das glândulas sebáceas espalhadas pelo corpo (glândulas sebáceas não são encontradas nas palmas das mãos e dos pés). O suor contém substâncias orgânicas e inorgânicas produzidas pelas glândulas apócrinas e écrinas, respectivamente, sendo que, estas últimas são as únicas encontradas no tecido tegumentar das impressões digitais. As glândulas apócrinas encontram-se nas regiões da virilha, axilas e perianal. A constituição dos componentes encontrados nas impressões

digitais são água (99%), e substâncias orgânicas e inorgânicas (1%) [22]. Na Tabela 5 estão relacionados os principais componentes químicos das secreções encontrados nas impressões digitais.

Tabela 5. Constituição química das secreções encontradas nas impressões digitais (Adaptada de [22])

Fonte	Constituintes inorgânicos	Constituintes orgânicos
Glândulas Ecrinas	Cloretos Íons metálicos (Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺) Sulfatos Fosfatos Amônia Água (>98%)	Aminoácidos Proteínas Ureia Ácido Úrico Ácido Láctico Açúcares Creatina Colina
Glândulas Apócrinas	Ferro Água (>98%)	Proteínas Carboidratos
Glândulas Sebáceas		Esteróis Glicerídeos (30-40%) Ácidos graxos livres (15-25%) Ésteres (20-25%) Óleos (10-12%) Ésteres Esteróis (2-3%) Esteróis (1-3%)

A partir do século XIX, as impressões digitais entraram no contexto da ciência forense com estudos de casos dessas evidências em marcas de sangue com objetivo de estabelecer a autoria de quem as produziram [23]. Assim, os trabalhos relacionados a este campo de atuação forense avançaram e novas metodologias para a revelação de impressões digitais latentes e para identificação de substâncias neste vestígio tem sido estudadas [23] [24] [25] [26].

Leggett e colaboradores desenvolveram nanopartículas funcionalizadas para identificar a substância cotinina (metabólito do tabaco) em impressões digitais utilizando fluorescência. O corpo, ao liberar o suor, também excreta várias substâncias que, em baixas concentrações, ficam armazenadas nesse plasma sanguíneo ultrafiltrado, inclusive metabólitos de drogas. Quando esfregamos nossa pele, o suor e as substâncias nela contidas são transferidas para a impressão digital. Desta forma, quando uma superfície é tocada, além da

água presente no suor, íons inorgânicos, lactato, ureia, aminoácidos, e outros metabólitos também são transferidos para essa superfície. A técnica de fluorescência permite detectar cotinina a uma concentração de 780,8 ng.mL⁻¹, mesmo na presença de nicotina e outros metabólitos [23].

Zhang e colaboradores desenvolveram um novo método, combinando cromatografia líquida e espectrometria de massa (LC-MS) para análise de MA e seu principal metabólito em impressões digitais. O limite de detecção foi de 1,5 ng e o limite de quantificação de 5,0 ng por cotonete utilizado para coleta. Os valores médios de recuperação foram superiores a 70,1%. Também foram detalhados os fatores de influência para a detecção de MA em impressões digitais, como tipos de substratos, métodos de desenvolvimento e métodos de extração. Os resultados mostraram a obtenção de boas relações de recuperação em superfícies de madeira pintada e substratos lisos. Os resultados também indicaram que o método mencionado poderia ser aplicado na análise de evidências coletadas em vestígios forenses [24].

West e colaboradores conseguiram identificar *ecstasy*, cocaína, ketamina e anfetamina em impressões digitais por meio da espectroscopia Raman, após os vestígios latentes serem revelados com pó revelador e destacados da superfície primária com fita adesiva. Eles estudaram 70 impressões digitais dopadas com os aludidos entorpecentes, tocando os dedos polegares em uma lâmina de vidro preparada para cada uma das substâncias com 3 a 8 µg. Em seguida, os dedos polegar e indicador foram esfregados e depois a impressão digital foi aplicada em uma lâmina de vidro limpa [25].

Tsuchihashi e colaboradores estudaram a determinação de MA por espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT- Raman). O trabalho

deles abordou a identificação de MA em bolsas de polietileno e em fitas adesivas, na comparação dos espectros de MA com outras drogas, como sulfato de anfetamina, cloridrato de etilamfetamina, cloridrato de metilefedrina e cloridrato de efedrina. Esses autores compararam também o espectro Raman da MA com espectro de absorção no infravermelho e estudaram a relação da concentração de MA com a intensidade dos picos dos espectros. Por fim, eles também obtiveram espectros no FT-Raman da mistura da droga com cafeína e benzoato de sódio e depois compararam com o espectro da droga pura, com o intuito de verificar a possibilidade de distinguir os picos correspondentes à MA mesmo em misturas. Os autores concluíram que a técnica de FT-Raman é uma ferramenta poderosa na determinação não destrutiva de MA [26].

Yang e colaboradores estudaram uma metodologia de otimização do efeito SERS utilizando nanopartículas de ouro (AuNPs) com propriedades magnéticas para detectar traços de droga em saliva e em impressões digitais. A substância objeto de estudo foi a cotinina. As AuNPs adquiriram propriedades magnéticas na presença de inositol hexakisfosfato. O método demonstrou um LOD de 8,8 ppb para a cotinina em saliva e $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L (1,76 mol/mL) em impressão digital [27].

1.4 Justificativa

A Polícia Federal do Brasil, em obediência à legislação nacional vigente (Lei nº 6.368/76) e aos protocolos internacionais, adota testes colorimétricos preliminares para identificação de drogas ilícitas (sejam elas sintéticas ou tradicionais), de forma célere e prática, com uso de reagentes manejáveis e de transporte fácil. Assim, com base no laudo provisório, o suspeito de tráfico de

entorpecentes pode permanecer encarcerado por dias ou até meses à espera da verificação definitiva acerca da eventual ilicitude da substância que ele portava. Entretanto, é possível que, após o exame preliminar, ou uma determinada droga não seja confirmada, ou também alguma substância que não seja ilícita possa ser apontada como tal. Isto ocorre porque muitos entorpecentes são compostos na realidade por uma mistura complexa de várias substâncias químicas [28]. Desta forma, testes preliminares mais confiáveis são fundamentais para o aprimoramento da justiça e das instituições policiais. Um caminho para isso pode ser a simplificação dos exames analíticos utilizados para subsidiar os laudos conclusivos, por meio do desenvolvimento de novas metodologias que se utilizem de equipamentos portáteis, como por exemplo as baseadas em nanossistemas. De fato, as características observadas em moléculas de drogas quando associadas a nanopartículas, podem fundamentar pesquisas e aperfeiçoar protocolos de identificação de drogas *in loco*.

Os avanços relacionados à nanotecnologia tornaram as técnicas de espectroscopia poderosas ferramentas para a área forense, em especial no que se refere à detecção de substâncias psicotrópicas. Nanopartículas vêm sendo utilizadas para amplificação de sinal de metodologias espectroscópicas ou ainda para aumento da seletividade de respostas [29]. As espectroscopias UV-vis e Raman [30] constituem alguns dos métodos mais utilizados nas determinações analíticas em diversas áreas [31].

Considerando que a maioria das abordagens em nanotecnologia se relaciona com o estudo e aplicação de materiais apresentando ao menos uma dimensão aproximada entre 1 a 100 nm [30], o uso de sistemas nanoestruturados pode agregar propriedades ópticas altamente desejáveis. Em

termos experimentais e como características obtidas com nanopartículas, podem ser observados padrões de difração de moléculas cada vez maiores [32] e o acoplamento da sobreposição de estados quânticos em microrressonadores [32] [33].

Sistemas nanoestruaturados como nanopartículas metálicas (p.ex.: AuNPs e AgNPs), quando aglutinadas a moléculas orgânicas, podem atuar como amplificadores de sinais ópticos, o que permite acentuar a detecção em instrumentos de espectroscopia [34] [35]. Também é possível observar a ocorrência de alteração de cor [36] [37] [38]. Esses dois fenômenos são observados, por exemplo, na detecção de MA em urina, utilizando suspensão aquosa de AuNPs [37]. Estas observações podem basear o desenvolvimento de nanossensores que viabilizem a utilização de instrumentação analítica portátil e permitir a detecção rápida e diagnóstico inequívoco de drogas com maior acurácia.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Elaborar metodologia para detecção de MA na forma do cloridrato de MA, utilizando Espalhamento Raman Intensificado por Superfície - SERS pelo uso de nanopartículas de prata dispersas em filme de gel de agarose como substrato SERS-ativo.

1.5.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a MA padrão por meio da técnica de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H) e das espectroscopias Raman e de absorção no UV-Vis;
- b) Caracterizar o substrato SERS-ativo por meio microscopia eletrônica de transmissão (MET) e das espectroscopias Raman e UV-Vis;
- c) Utilizar o efeito SERS para obter as isotermas de adsorção de MA sobre substrato SERS-ativo de filmes compostos por AgNPs, dispersas em um gel de agarose depositado sobre lâminas de vidro ou de alumínio;
- d) Comparar os dados de SERS obtidos com os modelos de adsorção de Langmuir, Frumkin e Freundlich de modo a compreender melhor a interação da droga e do substrato;
- e) Verificar a possível atividade SERS do substrato ao longo do tempo;
- f) Avaliar a metodologia desenvolvida para identificar MA em impressões digitais.

2. Fundamentação Teórica

O uso de métodos espectroscópicos como ferramenta analítica apresenta como principais vantagens serem não destrutivos (em geral), necessitar de pequenas quantidades de amostra e a rapidez na análise [31] [39] [40]. Nesta sessão serão vistos os princípios teóricos dos métodos de caracterização, fenômenos e ferramentas utilizadas no escopo deste trabalho.

2.1 Métodos de Caracterização

2.1.1 Espectroscopia de Absorção Molecular no Ultravioleta/Visível – UV-Vis

A técnica de UV-Vis é amplamente utilizada em laboratórios com diversas finalidades, tais como: estudar a concentração do analito (lei de Beer Lambert), caracterização, polidispersão, etc. [31].

A técnica concentra sua aplicação na faixa de comprimento de onda entre 200 e 780 nm, sendo que entre 200 e 390 nm refere-se ao ultravioleta (UV) e entre 390 e 780 nm à faixa do visível, como mostra a Figura 7. Baseada na medida da transmitância ou absorbância de soluções/suspensões contidas em células transparentes com caminho óptico definido, a espectrofotometria de absorção molecular no UV-vis apresenta utilidade na determinação qualitativa e quantitativa de compostos inorgânicos e orgânicos, bem como em estudos sobre a estrutura eletrônica de íons complexos, estudos cinéticos, na determinação de parâmetros termodinâmicos, etc.

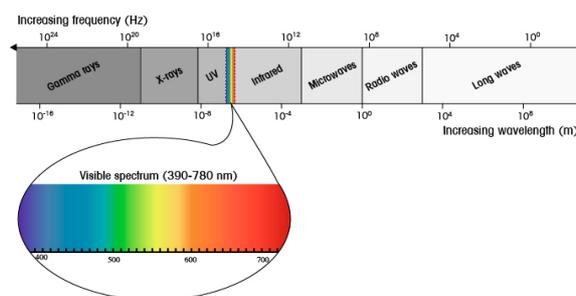


Figura 7. Representação do espectro do visível. Retirada de [31].

Ainda que possam ser encontrados no mercado equipamentos com grande variação de preço, o custo de sua utilização é relativamente baixo [41].

Os fundamentos para a utilização da espectroscopia de absorção no UV-Vis como ferramenta de estudo são baseados na estrutura (simetria) do composto investigado, nos tipos e simetrias dos orbitais moleculares envolvidos no estado fundamental e excitado (σ , σ^* , n , π e π^*) responsáveis pela absorção de radiação eletromagnética. Em geral, transições eletrônicas envolvendo orbitais σ e σ^* ($\sigma^* \leftarrow \sigma$) envolvem ligações σ e são altamente energéticas, absorvendo radiação abaixo de 150 nm. Há também elétrons ocupando orbitais não ligantes (n), os quais podem dar origem a transições do tipo $\sigma^* \leftarrow n$ e $\pi^* \leftarrow n$ [31]. As transições $\sigma^* \leftarrow n$, em geral, absorvem na faixa de 150 a 200 nm. Já as transições do tipo $\pi^* \leftarrow n$ e $\pi^* \leftarrow \pi$, presentes em compostos orgânicos com insaturações e/ou heteroátomos, são observadas na faixa de 200 a 700 nm. Cabe destacar que a descrição de transições eletrônicas como transições entre orbitais é uma forma simplificada, pois na realidade a transição ocorre entre estados eletrônicos. A representação simplificada das transições eletrônicas envolvidas no UV-Vis encontra-se na Figura 8.

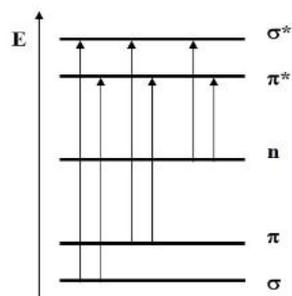


Figura 8. Representação das transições eletrônicas envolvidas na UV-Vis. Adaptada de [31].

2.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Enquanto a microscopia de luz convencional permite uma magnificação de até 2.000 vezes, a MET possui uma resolução que permite chegar a magnificações de cerca de 1.000.000 de vezes [42], possibilitando observar estruturas com dimensões nanométricas [43]. Considerado um dos instrumentos mais poderosos para identificação de materiais nanoestruturados, o microscópio eletrônico de transmissão fornece informação visual direta do tamanho, morfologia e dispersão de materiais particulados.

O fenômeno físico consiste na incidência de um feixe de elétrons produzidos pelo aquecimento de um filamento de tungstênio e acelerados a partir do topo para a base do instrumento por uma diferença de potencial de 100 a 300 keV, entre catodo e anodo. Lentes eletromagnéticas direcionam o feixe de elétrons que atravessaram a amostra, o que aumenta consideravelmente o poder de resolução. Duas imagens podem ser formadas: imagem de campo claro e imagem de campo escuro. A primeira é formada a partir da seleção do feixe de elétrons incidentes que atravessam a amostra, ao passo que a segunda se forma com base no feixe de elétrons espalhados [43].

A Figura 9 representa os componentes de um microscópio eletrônico de transmissão. Um microscópio eletrônico de transmissão é formado por:

- Sistema de lentes condensadoras: Responsável por reduzir a seção transversal do feixe elétrons e iluminar a área de interesse;
- Corrente da lente objetiva: Controla o foco e a ampliação inicial;
- Corrente da lente projetiva: Proporciona ampliações de 1000 a 250.000 ×;
- Sistema de vácuo: Pressão menor que 10^{-4} torr, bomba difusora e rotativa.
- Sistema de registro de imagens: Filmes negativos ou CCD (*charge-coupled device*).

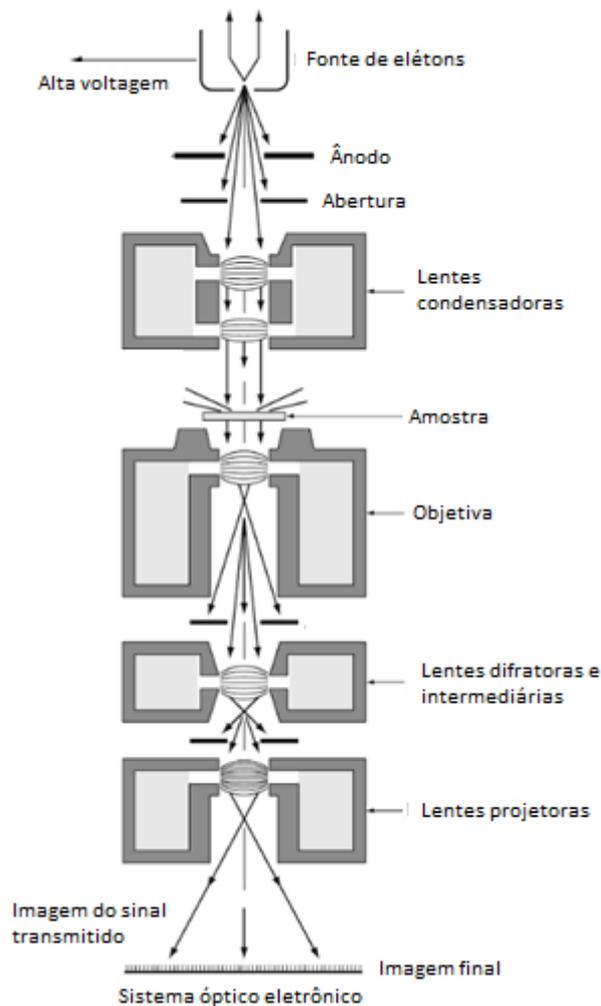


Figura 9. Desenho esquemático dos principais componentes de um microscópio eletrônico de transmissão. Adaptada de [43].

2.1.3 Ressonância Magnética Nuclear

Todos os núcleos atômicos apresentam um momento magnético de spin nuclear que pode ser zero (se possuírem um número par de prótons e nêutrons) ou diferente de zero (se possuírem um número ímpar de prótons e nêutrons). Existem muitos isótopos de núcleos com spin (I) inteiro (ex. 1, 2, 3...), outros com spin fracionário (ex.: $1/2$, $3/2$, $5/2$...) e poucos não possuem spin ($I=0$) (ex.: ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S ...). Existem alguns isótopos que são muito utilizados em análises, em especial na área de química orgânica, como por exemplo ^1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P , todos com $I = 1/2$. Uma vez que a análise desse estado de spin é direta, a discussão abaixo se restringirá aos núcleos de spin $I = 1/2$ [45].

Quando um núcleo de spin nuclear $I = 1/2$ se encontra na presença de um campo magnético externo surgem dois estados de spin nuclear, $+1/2$ e $-1/2$. O estado de menor energia ($+1/2$) corresponde ao alinhamento do momento magnético nuclear com o campo magnético externo (B_0), enquanto que no estado de maior energia ($-1/2$) esses momentos se contrapõem. Quanto maior for a intensidade do campo magnético externo, maior será a diferença de energia (ΔE) entre esses dois estados. A Figura 10 mostra o efeito da intensidade de B_0 sobre ΔE , mostrando que a mesma também depende do momento magnético (μ) e do spin nuclear (I) [44] [45].

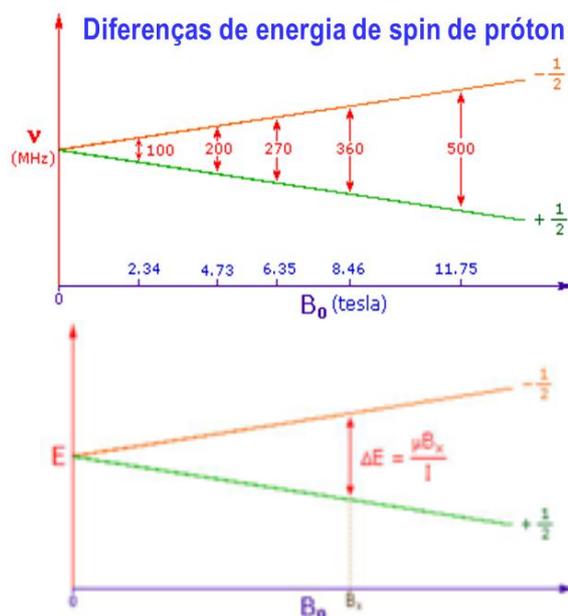


Figura 10. Efeito do campo magnético externo na diferença de energia entre os estados de spin nuclear. Retirada de [45].

Lembrando que $\Delta E = h\nu$ e $\mu(^1\text{H}) = 2.7927$, a Figura 10 também mostra que a frequência de ressonância para promover a mudança de estado de spin depende de B_0 . Note que as frequências de ressonância aparecem na faixa de ondas de rádio e TV, isto é, de 20 a 900 MHz.

Uma vez que todos os prótons de uma molécula têm o mesmo momento magnético, seria esperado que todos os prótons apresentassem um único sinal de ressonância para um mesmo valor de B_0/ν . No entanto, não é isso que ocorre na realidade. Cada próton em uma molécula está ligado covalentemente a outros átomos com diferentes ambientes eletrônicos. Como se sabe, elétrons possuem carga e também se movem em resposta ao campo magnético externo (B_0), gerando assim um campo secundário que se opõem ao campo aplicado. Esse campo secundário blindo o núcleo em relação ao campo aplicado, de tal forma que B_0 precisa ser aumentado para que possa atingir a condição de ressonância (absorção da radiofrequência). Assim, quanto mais blindado estiver o núcleo,

mais alto será o campo em que o sinal de ressonância será observado. Por exemplo, no caso dos prótons da água, para um campo externo aplicado de 2.3487 T, o sinal de ressonância será observado para um campo de 2.3488 T, ou seja, uma diferença de 0,0042%, ou seja, 0,000042 ou 42 partes por milhão (ppm) [45]. Diferentemente das espectroscopias FTIR e UV-Vis onde os picos de absorção estão unicamente localizados (não dependem do equipamento), na espectroscopia RMN a localização dos diferentes sinais de RMN dependem do campo externo aplicado e da frequência de rádio utilizada na excitação. Como os equipamentos de RMN não apresentam campos magnéticos idênticos, as frequências de ressonância para um mesmo composto serão diferentes de equipamento para equipamento. Para resolver esse problema, usa-se como referência o Trimetil silano (TMS) que é adicionado à amostra analisada e os sinais de ressonância são dados em termos do deslocamento químico, δ (em ppm) em relação ao sinal do TMS, onde $\delta = \frac{\nu_a - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6$, ν_a = frequência da amostra e ν_{ref} = frequência da referência (TMS) [45].

2.1.4 Espalhamento Raman

O estudo de moléculas orgânicas por meio de suas propriedades vibracionais conta geralmente com a utilização de duas metodologias como ferramentas analíticas (uma complementar à outra), quais sejam: a espectroscopia de absorção no infravermelho e o espalhamento Raman [46]. A primeira é um processo de um único fóton, ou seja, um fóton será absorvido para excitar uma mudança de estado vibracional sempre que a energia do fóton corresponder à diferença de energia entre dois estados vibracionais e se, durante a vibração, houver variação do momento de dipolo. Já a espectroscopia

Raman baseia-se na variação do momento dipolo induzido (da molécula) pela radiação excitante. Assim, moléculas diatômicas homonucleares como N_2 e O_2 , por exemplo, não apresentam absorção no espectro infravermelho pois, durante a vibração, não existe variação do momento de dipolo. Por outro lado, essas moléculas apresentam transições Raman pois durante a vibração existe variação da polarizabilidade e, conseqüentemente, do momento de dipolo induzido [39].

C. V. Raman, em 1928, observou que para moléculas com estruturas diferentes, o comprimento de onda da radiação espalhada era diferente do comprimento de onda da radiação incidente [31]. Ele observou em aproximadamente 60 líquidos estudados que a luz espalhada continha coloração diferente da luz incidente. Em outras palavras, a luz espalhada era polarizada (Figura 11) [47].

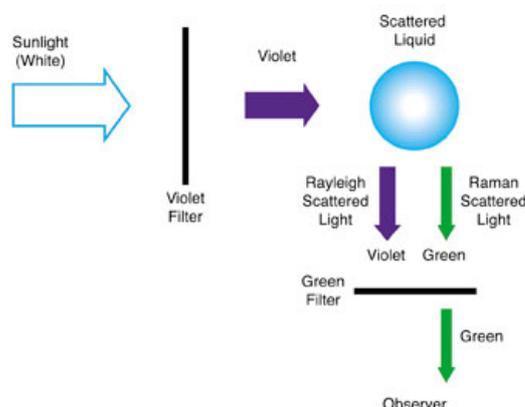


Figura 11. Representação esquemática do experimento conduzido por Raman. Retirada de [47].

Apesar disto, somente a partir da década de 1960, período em que os lasers se tornaram disponíveis, a espectroscopia Raman passou a ser utilizada com maior frequência. A energia total de uma molécula é dada pelo somatório de três tipos: eletrônica > vibracional > rotacional (apenas para o estado gasoso). Sendo representadas aqui em ordem decrescente de energia. A intensidade do sinal Raman é cerca de 0,001% da intensidade da fonte laser e por este motivo

melhores resultados são obtidos com a utilização de lasers de maior potência, em equipamentos altamente luminosos e com sistema otimizado de rejeição do sinal Rayleigh. Atualmente são utilizados lasers de radiação monocromática da região do UV ao infravermelho.

O espalhamento Raman constitui um fenômeno do espalhamento inelástico da luz, onde a energia do fóton espalhado pode ser menor (Raman-Stokes) ou maior (Raman-Anti-Stokes) que a energia do fóton incidente.

Na espectroscopia eletrônica de absorção molecular (UV-Vis) as transições eletrônicas em uma molécula ocorrem entre estados eletrônicos bem definidos, cujas energias são quantizadas. Na espectroscopia Raman é um pouco diferente, a incidência de radiação pode provocar excitação da molécula de um nível vibracional do estado eletrônico fundamental para um estado chamado de virtual, que decai de forma rápida (10^{-14} s) para outro nível vibracional do estado eletrônico fundamental, o que dá origem à radiação espalhada, conforme Figura 12. Quando o fóton incidente possui a mesma energia que o fóton espalhado, esse efeito recebe o nome de espalhamento Rayleigh ou elástico.

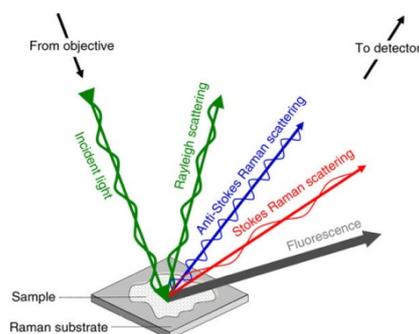


Figura 12. Representação do fenômeno de espalhamento de luz. Retirada de [48].

No espalhamento Raman-Stokes, após a interação do fóton incidente com a molécula há um decaimento do estado virtual para o estado vibracionalmente excitado. Lembrando que $E = h\nu$, o fóton espalhado terá energia ($h\nu_e$) menor que

a energia do fóton incidente ($h\nu_0$) e a diferença de energia corresponde à energia vibracional, ou seja, $h\nu_0 - h\nu_e = E_v = h\nu_v$, onde ν_v é a frequência vibracional. Já no espalhamento Raman-anti-Stokes, o fóton incidente, $h\nu_0$, encontrará a molécula em um estado vibracionalmente excitado do estado eletrônico fundamental e, neste caso, após a interação há o decaimento do estado virtual para o estado vibracional fundamental, sendo a energia do fóton espalhado ($h\nu_e$) maior que a energia do fóton incidente. De igual modo, a diferença de energia entre os dois estados será igual à energia vibracional, ($h\nu_e - h\nu_0 = e_v$) (Figura 13).

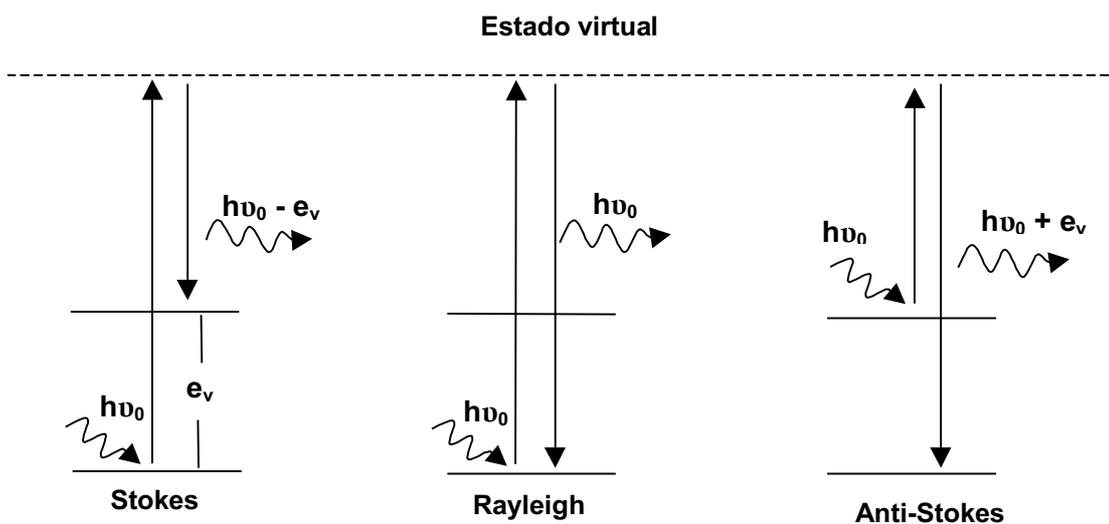


Figura 13. Esquemas dos mecanismos de espalhamento. Adaptada de [39].

A intensidade do sinal Raman está relacionada ao momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação incidente, conforme relação abaixo [39]:

$$I_R = |\vec{P}|^2 \text{ (Eq.1)}$$

onde \vec{P} representa o momento de dipolo induzido ($P = \alpha E$; α é a polarizabilidade da molécula e E é o vetor campo elétrico da radiação incidente).

A polarizabilidade pode ser expandida em uma série de Taylor, representada pela coordenada interna q :

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q + \dots \quad (\text{Eq. 1})$$

A coordenada q e o campo elétrico E podem ser descritos por:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \text{ e } E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (\text{Eq. 2})$$

ν_v é a frequência vibracional e ν_0 é a frequência da radiação incidente.

Substituindo a coordenada q e E na Eq.(2) e considerando que para pequenas vibrações (pequenos deslocamentos de q) são desprezados os termos de ordem superior, o momento de dipolo induzido passa a ser descrito como:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_v t) \quad (\text{Eq. 3})$$

Como $\cos(a)\cos(b) = \frac{1}{2}[\cos(a+b) + \cos(a-b)]$, a equação fica:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 E_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde o primeiro termo corresponde ao espalhamento Rayleigh e contém somente a frequência da radiação incidente. No segundo termo encontra-se a radiação do espalhamento Raman-anti-Stokes e o terceiro refere-se ao espalhamento Raman-Stokes. Para que os dois últimos termos contribuam para o momento de dipolo induzido é necessário ocorrer variação da polarizabilidade com a vibração, com deslocamento mínimo da coordenada q em relação à posição de equilíbrio, ou seja, $\left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 \neq 0$.

Contudo, a descrição clássica (acima) do espalhamento Raman não prevê a quantização dos estados vibracionais. Neste sentido, foi necessário desenvolver uma descrição mecânico-quântica para o espalhamento Raman. Nessa descrição, a polarizabilidade α_{mn} passa a ser representada pela equação:

$$\alpha_{mn} = \int \Psi_m \alpha \Psi_n d\tau \quad (\text{Eq. 5})$$

onde Ψ_m e Ψ_n são as funções de onda vibracionais dos estados inicial e final, respectivamente.

O vetor momento de dipolo tem três direções (x,y,z) e cada um desses componentes é afetado pelo campo elétrico local nas suas três direções. Assim, as componentes do momento de dipolo induzido nos eixos x, y e z, são representadas da seguinte forma [39]:

$$P_x = \alpha_{xx} E_x + \alpha_{xy} E_y + \alpha_{xz} E_z \quad (\text{Eq. 6})$$

$$P_y = \alpha_{yx} E_x + \alpha_{yy} E_y + \alpha_{yz} E_z \quad (\text{Eq. 7})$$

$$P_z = \alpha_{zx} E_x + \alpha_{zy} E_y + \alpha_{zz} E_z \quad (\text{Eq. 8})$$

Estas equações valem para o espalhamento Rayleigh, onde é considerada a polarizabilidade intrínseca da molécula. No espalhamento Raman, deve-se considerar as derivadas dos componentes α , em relação à coordenada normal (modo de vibração), $\alpha' = \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0$ que formam um tensor simétrico, ou seja, $\alpha'_{xy} = \alpha'_{yx}$, $\alpha'_{xz} = \alpha'_{zx}$ e $\alpha'_{yz} = \alpha'_{zy}$, conhecido como tensor Raman. Na transição entre os estados vibracionais n e m devem ser considerados os componentes $(\alpha_{ij})_{mn}$, onde i e j correspondem a x, y ou z. Para que uma transição Raman possa ser ativa (permitida), pelo menos um dos seis componentes das seis integrais do momento de transição [39] deve ser diferente de zero.

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \Psi_m \alpha_{ij} \Psi_n d\tau \quad (\text{Eq. 9})$$

Aplicando-se a Eq.(10) à série de Taylor e considerando apenas os primeiros dois termos da série obtém-se [39]

$$\alpha_{mn} = \alpha_0 \int \Psi_m \Psi_n d\tau + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 \int \Psi_m q \Psi_n d\tau \quad (\text{Eq. 10})$$

Como já mencionado, os estados vibracionais m e n são diferentes para o Raman Stokes e para o anti-Stokes, sendo a primeira integral do segundo membro igual à zero, uma vez que as funções de onda ψ_m e ψ_n são ortogonais. Então, o segundo termo deve, necessariamente, ser diferente de zero para que haja espalhamento Raman. Desta forma, duas condições devem ser observadas [39]:

- 1) $\left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 \neq 0$, ou seja, durante a vibração tem que haver variação do tensor de polarizabilidade; e
- 2) $\int \psi_m q \psi_n d\tau \neq 0$. Essa integral só será diferente de zero se $\Delta v = m-n = \pm 1$. O sinal positivo é para o espalhamento Raman-Stokes e o sinal negativo para o Raman anti-Stokes (v é o número quântico vibracional).

A probabilidade de uma transição Raman ocorrer é diretamente proporcional ao quadrado do tensor de polarizabilidade Raman $|(\alpha_{ij})|^2$. Portanto, a intensidade Raman deve guardar uma relação direta com a probabilidade de transição, bem como com a quarta potência da frequência da radiação espalhada [39]:

$$I_{mn} = \left(\frac{16\pi^2}{9c^4} \right) I_0 \nu^4 \sum_i \sum_j |(\alpha_{ij})_{mn}|^2 \quad (\text{Eq. 11})$$

I_0 é a intensidade da radiação incidente e ν a frequência da radiação espalhada. Lembrando que essa expressão é válida apenas para o espalhamento Raman fora da condição de ressonância. Assim, quanto maior a energia do fóton incidente, maior será a intensidade da radiação espalhada [39].

No entanto, a intensidade do espalhamento Raman para moléculas adsorvidas em condições de monocamada, na ausência de qualquer fenômeno de intensificação, é muito baixa. Isto se deve à baixa seção de choque para o espalhamento Raman, cerca de $10^{-30} \text{ cm}^2 \text{ Sr}^{-1} \text{ molécula}^{-1}$ (a da espectroscopia de absorção no infravermelho é $10^{-20} \text{ cm}^2 \text{ Sr}^{-1} \text{ molécula}^{-1}$) [46]. Assim, é possível intensificar o sinal Raman de algumas maneiras, sendo duas delas exemplificadas aqui: o efeito Raman ressonante e o efeito Raman intensificado por superfícies (SERS).

No efeito Raman ressonante, a intensidade do espalhamento Raman aumenta significativamente quando a energia do fóton incidente coincide com a energia de uma transição eletrônica de alta probabilidade da molécula investigada. Nestes casos podem ser observadas intensificações de até 10^6 vezes em relação ao sinal Raman fora da ressonância [49].

A Figura 14 mostra espectros Raman ressonante da bixina (um carotenoide). Nesse caso, clorofórmio foi utilizado como padrão interno (sinais Raman marcados com um asterisco). Nota-se claramente um aumento expressivo de alguns sinais Raman da bixina quando a radiação laser excitante se aproxima do máximo de absorção em ca. 500 nm.

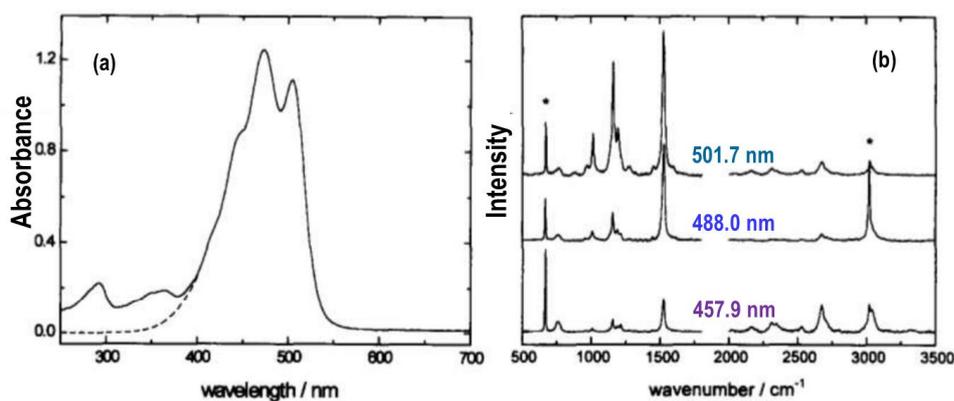


Figura 14. a) Espectro de absorção UV-vis de um solução de bixina 10^{-5} M (um carotenoide) em CHCl_3 . b) Espectros Raman ressonante da mesma solução de a) para as radiações laser excitantes indicadas. Adaptada de [50]. O * indica o sinal Raman do padrão interno, CHCl_3 .

2.2 Efeito SERS

Em 1974, Fleischmann e colaboradores, ao realizarem experimentos de óxido-redução em solução aquosa de piridina ($5,0 \times 10^{-2}$ mol/L em KCl 0,1 mol. dm^{-3}) utilizando eletrodo de prata, observaram espectros com excelente relação sinal/ruído. Esse resultado foi atribuído inicialmente ao aumento da área superficial (maior rugosidade no eletrodo) [51]. Jeanmarie e Van Duyne, três anos depois, em seus trabalhos subsequentes ao de Fleischman demonstraram que o simples aumento da área não era suficiente para explicar o elevado fator de intensificação de sinal observado [52]. Em teoria, esperava-se uma contribuição do aumento da área de superfície para a intensificação de sinal em uma ou duas ordens de grandeza, mas os resultados indicavam aproximadamente 10^6 . Esse novo efeito foi chamado de *Surface Enhanced Raman Scattering* – *SERS*. Daí pra frente, outros tipos de superfícies foram estudados e classificados como geradores de efeito SERS, por exemplo: colóides de alguns metais (Ag, Au e Cu, os mais importantes) e filmes metálicos depositados em ultra-alto vácuo. Além disso, interações entre metal-gás, metal-

vácuo e sólido-sólido apresentam interfaces geradoras de efeito SERS da mesma forma que a interface metal-eletrólito [38].

Outra característica do efeito SERS é a capacidade de suprimir a emissão de fluorescência. Experimentos realizados com aminoácidos contidos no suor de impressões digitais em substratos de prata demonstram isso [53].

O fenômeno de intensificação superficial também pode ser observado no infravermelho - IR (SEIR – *Surface Enhanced Infrared*) para os mesmos substratos SERS ativos e a decisão de utilização de um ou de outro vai depender do sistema a ser estudado [54] [55] [56].

Os modelos teóricos existentes para explicar o efeito SERS se baseiam em dois tipos de mecanismos: o mecanismo eletromagnético (EM) e o mecanismo molecular ou químico (QM).

Quanto ao Mecanismo Químico (QM), Otto e colaboradores foram pioneiros a explicar o efeito SERS por meio de um mecanismo químico de transferência de carga [57]. Em um dos experimentos chave sobre o efeito SERS, mostraram que o sinal SERS do etileno adsorvido em matriz de argônio e prata em ultra alto vácuo era totalmente suprimido pela exposição do substrato a pequenas quantidades de O₂. Além disso, Rubim e colaboradores demonstraram que o O₂ também é capaz de suprimir o efeito SERS de piridina adsorvida em eletrodos de prata e cobre [58].

Quando o adsorbato e o substrato se aproximam um do outro, os orbitais moleculares do adsorbato se reorganizam em relação aos estados doadores ou receptores de elétrons do metal, formando complexos de transferência de carga [38]. Assim, ao interagir com a radiação incidente, pode ocorrer formação do par elétron-lacuna na superfície do substrato. Com a reorganização desses estados

energéticos, as regiões de alta densidade de estados se alargam e ocorre uma diminuição da quantidade de energia necessária para elétrons do adsorbato ocuparem lacunas na banda de valência na superfície do substrato e os orbitais receptores do adsorbato serem ocupados por elétrons de estados doadores no nível de Fermi do metal [59]. Ao se recombinarem, o par elétron-lacuna emite radiação, deixando a molécula adsorvida vibracionalmente excitada, ou seja, a radiação emitida corresponde ao espalhamento Raman-Stokes. Em resumo, existe uma interação química entre a molécula adsorvida e clusters de átomos de prata na superfície do metal numa região definida por contorno de grão, que recebeu a denominação de sítios de rugosidade de escala atômica (ASR) [46].

Um exemplo desse modelo químico pode ser observado na Figura 15, que representa a interação entre a piridina e clusters de AgNPs agregados sobre um eletrodo de Ag. Uma ligação σ é formada entre a molécula (par de elétrons livres do nitrogênio) e o metal (estados receptores). Outra região de alta densidade de estados doadores se forma próximo ao nível de Fermi favorecendo a retrodoação π para estados receptores do adsorbato. Quando a radiação excitante for suficiente para excitar essas transições de transferência de carga, ocorre uma intensificação do sinal Raman, semelhante ao que se observa no efeito Raman ressonante [46] [60].

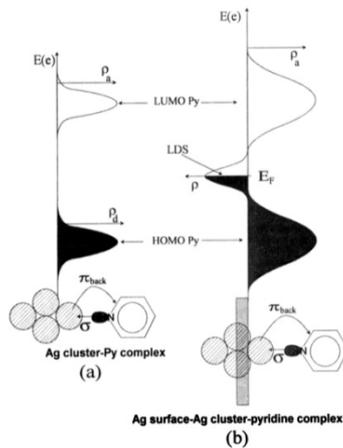


Figura 15. Modelo do complexo de transferência de carga formado pela interação entre a Piridina (Py) e clusters de nanopartículas de prata (Ag). a) complexo de clusters de prata e piridina dispersos em gás inerte; b) complexo cluster de prata e piridina em eletrodo de prata.. E_F , LDS, ρ , representam respectivamente o nível de Fermi da prata, a densidade local de estados, doadores e receptores de cargas. Retirada de [60].

Rubim e colaboradores concluíram que, para esse modelo, há uma dependência dos estados eletrônicos do metal com o potencial eletroquímico aplicado. A relação entre os estados doadores e receptores (LDS) da superfície do metal e os orbitais LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) e HOMO (*highest occupied molecular orbital*) do adsorbato sob um potencial aplicado pode ser observado na Figura 16 [60].

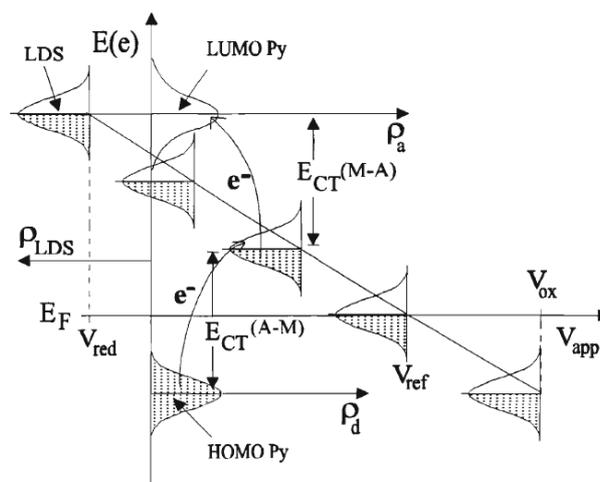


Figura 16. Representação esquemática da relação entre os LDS do metal e os orbitais HOMO e LUMO do adsorbato sob efeito de um potencial aplicado. Retirada de [60].

Da Figura 16, é retirada a seguinte expressão:

$$E_d = a(V_{\text{app}} - V_{\text{ref}}) + E_F \quad (\text{Eq. 12})$$

onde E_d é a posição do nível doador do lado do metal, V_{app} é o potencial aplicado e a representa uma constante que converte a diferença de potencial em diferença de energia.

Para o mecanismo eletromagnético, é preciso considerar que nanopartículas metálicas apresentam, devido a seu reduzido tamanho, uma propriedade de oscilação de sua nuvem eletrônica (Figura 17). Quando o sistema adsorbato-substrato de nanopartículas é submetido a uma radiação, o campo eletromagnético da superfície do substrato é intensificado por ressonância, ou seja, quando a oscilação do campo elétrico local da superfície da nanopartícula está em fase com a frequência da radiação incidente.. Esse efeito recebe a denominação de efeito plasmônico ou efeito de ressonância de plasmons de superfície localizado (LSPR) [38].

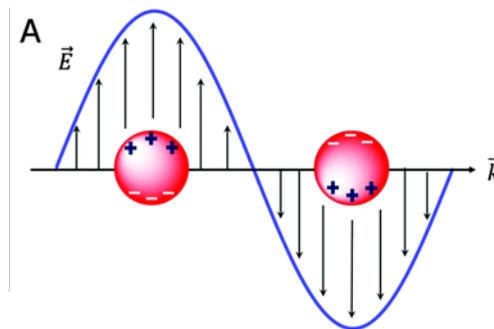


Figura 17. Representação esquemática da oscilação da nuvem eletrônica (plasmon de superfície) de nanopartículas ao serem submetidas a um campo eletromagnético. Adaptada de [61].

Apesar do comportamento óptico de nanopartículas intrigar a humanidade desde o início da era Cristã, ex: Taça de Lycurgus (Século 4 d.C.) que possui AuNPs em sua composição, os estudos relacionados ao mecanismo

eletromagnético e sua contribuição para o efeito SERS teve grande avanço no século passado, a partir das investigações das cores de nanoestruturas realizada por Mie e os modelos de Maxwell-Garnett que ajudam a entender a interação entre nanopartículas metálicas e o meio [62].

Considere-se a Eq.(14) para o momento de dipolo induzido:

$$\vec{P} = \vec{\alpha}\vec{E} \quad (\text{Eq. 13}),$$

onde $\vec{\alpha}$ é o tensor de polarizabilidade da molécula \vec{E} é o vetor campo elétrico local, que tem duas contribuições, E_0 , campo elétrico da radiação incidente e E_{out} , campo elétrico da radiação espalhada.

A intensificação do sinal Raman, via mecanismo eletromagnético, ocorre por meio da amplificação ressonante de E_{out} , dado por [63]:

$$E_{out} = E_0k + \alpha E_0k' \quad (\text{Eq. 14})$$

αE_0 representa o momento de dipolo induzido pela radiação incidente;

k e k' representam um conjunto de coordenadas cartesianas que definem a geometria de excitação em relação à esfera metálica (representando a superfície SERS-ativa);

α representa o tensor de polarizabilidade da nanopartícula metálica, que, para uma nanopartícula esférica pode ser dada por [63]:

$$\alpha_m = ga^3 \quad (\text{Eq. 15})$$

onde α_m corresponde a polarizabilidade da nanopartícula esférica, a representa ao raio da esfera e g pode ser expressado por:

$$g = \frac{\varepsilon_i - \varepsilon_0}{\varepsilon_i + 2\varepsilon_0} \quad (\text{Eq. 16})$$

ε_i e ε_0 representam, respectivamente, as constantes dielétricas no interior da nanopartícula metálica e do meio dielétrico (vácuo ou solvente) dependendo de onde ela se encontra.

Assim, para que a condição de ressonância seja atendida, a parte real ε_i deve ser igual a $-2\varepsilon_0$ e, concomitantemente, a parte imaginária de ε_i precisa ser muito pequena. Metais como prata, ouro e cobre satisfazem essa condição devido a sua alta refletividade.

Tamanhos e formas com maior heterogeneidade somados a um alto estado de agregação das nanopartículas promovem uma maior indefinição da banda de absorção que corresponde à excitação dos plasmons de superfície. Essa densidade de estado pode ser medida por meio do espectro de absorção no UV-Vis-NIR, ou seja, a depender do tamanho, forma e estado de agregação, as nanopartículas podem absorver numa faixa de comprimento de onda compreendida entre 385 nm até o infravermelho próximo [64].

Desta forma, quando a radiação laser incidente encontra-se em fase com uma dessas ressonâncias, a excitação dos SPRs promove uma intensificação do campo elétrico local que pode chegar até a 10^6 ordens de grandeza. Essa intensificação pode ser observada tanto para o campo elétrico da radiação incidente, como para a radiação espalhada [63].

Esse mecanismo, também chamado de intensificação de longo alcance, pode ocorrer sem que necessariamente a molécula esteja em contato direto com a superfície metálica [63].

As contribuições dos mecanismos químico e eletromagnético são complementares entre si para a definição da intensificação total observada no efeito SERS. Em geral, o complexo formado entre o substrato e a molécula

intensifica o sinal Raman em cerca de 10 a 10^2 , ao passo que o mecanismo eletromagnético pode levar a intensificações do sinal Raman da ordem de 10^6 a 10^8 . Como o mecanismo eletromagnético intensifica os fótons espalhados, ele também intensificará o sinal Raman ressonante, podendo gerar assim fatores de intensificação da ordem de 10^{10} . Destaca-se que a literatura tem relatado fatores de intensificação SERS da ordem de 10^{14} - 10^{15} [65] [66], no entanto, esses valores tão altos são ainda questionáveis [67].

Oliveira e Rubim estudaram isotermas de adsorção para dois tipos de substratos SERS-ativos de: AgNPs dispersas em água (AgNPs/Sol); e AgNPs dispersas em gel de agarose (AgNPs/Agar). A Rodhamina 6G (R6G) foi utilizada para avaliar os dois substratos. R6G adsorve em ambos os substratos seguindo as isotermas de Langmuir com constantes de adsorção muito semelhantes. Os autores observaram que o efeito SERS de R6G em AgNPs/Agar é aproximadamente 10 vezes mais intenso do que em AgNPs/Sol, devido ao confinamento das moléculas de R6G dentro da matriz de gel. Outros corantes foram também utilizados [68].

O efeito SERS é encontrado com maior intensidade em prata, ouro e cobre, mas de acordo com Faria e colaboradores, é também observado em outros metais, tais como platina e paládio. A prata é o metal com maior fator de intensificação [38] [39] [69] [70] [71] e, por este motivo foi escolhida para este trabalho.

2.2.1 Hot Spots

Para uma maior compreensão do efeito SERS, é importante compreender a atuação dos sítios quentes ou “*hot spots*” nesse processo. Esse fenômeno

ocorre quando há a formação de dímeros, trímeros ou aglomerados maiores de nanopartículas e, no espaçamento entre eles, há um significativo aumento do campo eletromagnético em detrimento a um conjunto de fatores de ressonância, cujo principal para a maioria dos casos é a ressonância de plasmons de superfície localizada (*localized surface plasmons resonance* - LSPR); e, em segundo plano, pode-se citar a ressonância de transferência de carga envolvendo o sistema complexo metal-molécula e o efeito Raman ressonante da molécula adsorvida [72].

Grésillon e colaboradores foram os primeiros a observar a intensificação do campo elétrico em sítios específicos, cuja denominação “*hot spots*” foi dada por este grupo, em aglomerados de AuNPs em substrato de vidro, como consequência da excitação de LSPRs (Figura 18). As medições foram realizadas por meio de microscopia óptica de varredura de campo próximo [73].

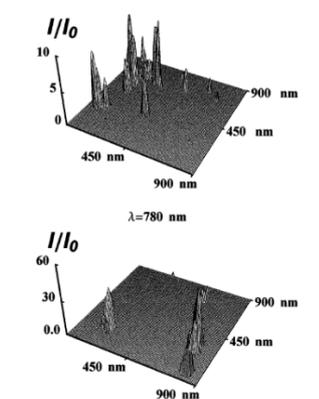


Figura 18. Representação das imagens de microscopia óptica de varredura de campo próximo para as excitações ópticas sobre o filme de ouro em vidro para diferentes comprimentos de onda. Adaptada de [73].

Outros trabalhos com “*hot spots*” como foco de estudo foram publicados desde então. Sem a pretensão de exaurir o tema, abaixo são relatados de forma

resumida os resultados de três artigos chaves para caracterização dos “hot spots”.

Michaels e colaboradores estudaram agregados de duas ou mais AgNPs por meio de medições por microscopia de força atômica – MFA para demonstrar suas propriedades SERS-ativas. Ainda utilizaram a R6G para observar e propor que a região com maior intensidade de sinal para uma única molécula que se situa na junção de partículas agregadas e que a atividade SERS é dependente da distância entre as partículas [74].

Svedberg e colaboradores aprisionaram AgNPs individualmente e fizeram a aproximação das mesmas para estudar a intensificação de sinal SERS nas regiões onde elas quase se tocam (Figura 19). A técnica consiste na utilização de um feixe de laser bem focado, cuja frequência seja menor que a de ressonância LSP. Assim, é possível capturar objetos dielétricos microscópicos em detrimento das altas forças de gradiente de campo elétrico [75].

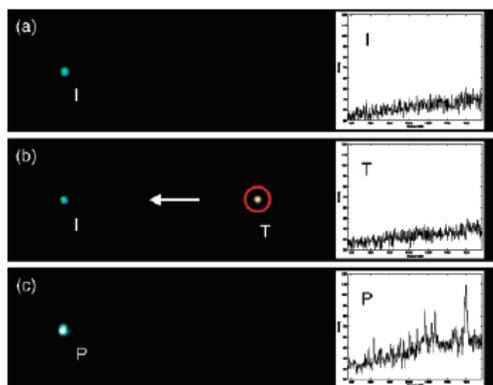


Figura 19. Representação gráfica do processo de captura, imobilização e aproximação de AgNPs. (a) Única partícula imobilizada (I) Nenhum sinal SERS. (b) Processo de aproximação de uma partícula capturada até a partícula imobilizada (T), Nenhum sinal SERS. (c) Introduzido contato de campo próximo ao par de partículas (P) Sinal SERS observado. Retirada de [75].

A morfologia das nanopartículas utilizadas neste trabalho foram esferoides com diâmetro médio de 40 nm. Como molécula sonda para medir o SERS nos dímeros, foi utilizado tiofenol, a uma concentração de 10 mM. Os

autores observaram um aumento de intensidade de cerca de 20 vezes comparado a molécula de tiofenol adsorvida em monômeros [75].

Uma nova maneira para preparar regiões de “*hot spot*” sem utilizar agentes agregadores como NaCl, por exemplo, foi proposta por McLellan e colaboradores. O método desenvolvido implica na deposição de AgNPs de morfologia cúbica em uma superfície metálica de prata ou ouro. Nanocubos de prata foram funcionalizados com 1,4-benzenoditol (1,4-BDT), depositados sobre diferentes substratos, excitados com laser em 514 nm e medidos os espectros SERS individuais característicos de acordo com o tamanho, a forma e a orientação de cada partícula. Eles testaram nanopartículas cúbicas e esféricas para fins comparativos. Essa abordagem se destaca pela sua simplicidade e reprodutibilidade de regiões quentes nos cantos dos nanocubos de prata, próximos à superfície metálica, formando sítios SERS capazes de fazer detecção em condições de uma molécula (*Single Molecule Detection*- SMD) [76].

2.2.2 Aplicações do efeito SERS

Na literatura é possível encontrar diversos substratos que proporcionam efeito SERS. Um exemplo é o filme de prata sobre lâmina de vidro [68].

Uma das aplicações deste fenômeno é a melhoria da relação sinal ruído no espectro Raman. A Figura 20 compara dois espectros de um filme de ftalocianina de cobalto tetrasulfonada (CoPcTs). No primeiro Figura 20 (a) o filme de CoPcTs foi adsorvido sobre uma lâmina de vidro e submetido a radiação excitante em 632,8 nm. Na Figura 20 (b) o mesmo procedimento foi realizado, porém, antes da aplicação do filme de CoPcTs, a lâmina foi recoberta com um filme de prata.

Ao analisar comparativamente os espectros, pode-se notar que o espectro da Figura 20 (b) possui uma relação sinal/ruído bem superior àquela do espectro (a).

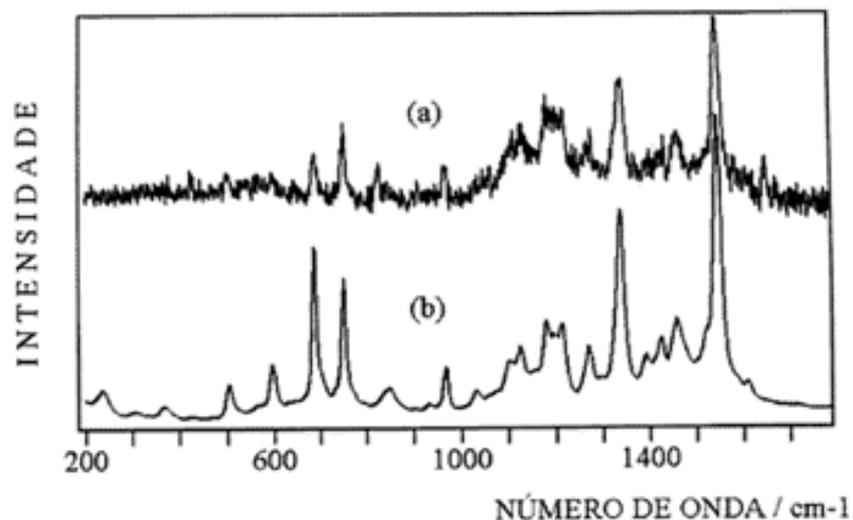


Figura 20. Espectros Raman do filme de CoPcTs irradiado por laser em 632,8. a) lâmina sem recobrimento com filme contendo AgNPs. b) lâmina recoberta com filme contendo AgNPs. Retirada de [38].

Além do filme de prata, outros substratos podem ser explorados a depender da finalidade analítica: filmes metálicos em interfaces líquidas, colóides, metal finamente dividido, etc [38].

2.3 Substratos SERS ativos

2.3.1 Agarose

Conhecida como *Kanten* no Japão e *Dongfen* na China, *agar-agar* na península malaia, a agarose é um hidrocoloide cuja matéria prima para extração é uma diversidade de gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas, da classe Rodophyta, que também recebem a denominação de agarófitas. O ágar foi introduzido na cultura europeia por meio dos chineses instalados nas Índias Orientais que importavam o Kanten do Japão. Sua descoberta ocorreu em 1658. Durante um inverno muito forte, a excursão do imperador japonês se perdeu e

encontraram refúgio em uma pequena taberna, onde foi oferecido à comitiva uma sopa a base de geleia. Assim, é o ficocoloide de utilização mais antiga, tendo sua aplicação inicialmente direcionada ao ramo alimentício [77]. Hoje, é utilizada na indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética, papel, têxtil, petrolífera e biotecnologia. Sua estrutura é de um carboidrato sustenta a parede celular das algas agarófitas. Pode ser encontrado de duas maneiras: sob a forma de sais de cálcio ou uma mistura de sais de cálcio e magnésio, que por sua vez dão origem a dois tipos de polímeros. A agarose é neutra, enquanto que a agarpectina apresenta carga sendo sulfatada [77].

Acerca das propriedades físico-químicas da agarose, destacam-se sua solubilidade rápida em água a altas temperaturas ($> 50^{\circ}\text{C}$) e geleificação entre 32 e 45°C . A estrutura de dupla hélice do gel de agarose, uma vez agregada, é capaz de absorver as moléculas de água em seus interstícios formando gel termo-reversível. Sua capacidade de absorção de água corresponde a cerca de 20 vezes o seu peso e tem sua estabilidade dependente de sua hidratação e carga elétrica levemente negativa. Além disso, seu pH se apresenta entre 6,8 e 7 e é atóxica [77]. Uma representação da molécula de agarose pode ser observada na Figura 21.

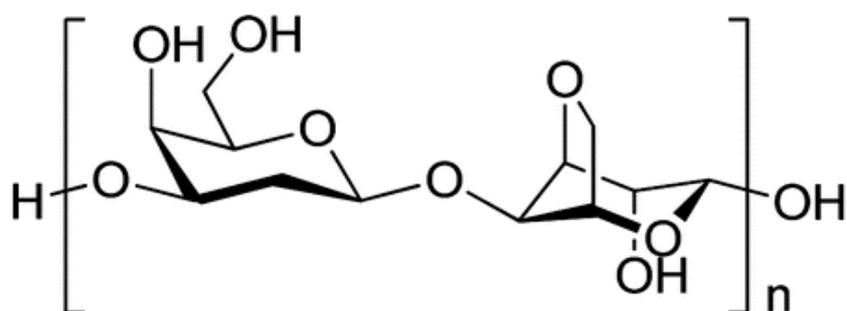


Figura 21. Representação da molécula de agarose. Retirada de [78].

2.3.2 Nucleação e Crescimento de AgNPs em Gel de Agarose

Nesta seção, a abordagem será sobre como o gel de agarose pode otimizar a síntese de um substrato adequado para este trabalho. Ocorre que, ao longo de sua estrutura, há a formação de diversos poros de dimensões nanométricas. Assim, na fase aquosa são potencialmente formadas nanopartículas de tamanhos maiores e, além disso, as menores são retidas nestes interstícios [79].

A rede polimérica do gel ainda atua no controle da morfologia, do tamanho e da estrutura das partículas formadas, uma vez que as mesmas são confinadas em regiões de dimensões nanométricas [80].

Além disso, o gel de agarose funciona como uma armadilha para capturar moléculas. Ocorre que, nem todas as moléculas possuem afinidades com nanopartículas metálicas. Nesse caso, a superfície gelatinosa ajuda a aproximar, de forma mecânica, a molécula da nanopartícula, produzindo uma maior interação entre elas de forma forçada [81].

2.4 A Escolha da AgNPs e do laser em 632,8 nm

Substratos de AgNPs têm sido utilizados com frequência para gerar SERS e detectar drogas em baixas concentrações, sobretudo em fluidos biológicos, conforme poderá ser observado a seguir.

Subaihi e colaboradores utilizaram AgNPs para intensificar o sinal Raman (laser em 632,8 nm) e assim detectar codeína no plasma humano. Eles utilizaram a área do pico em 1281 cm^{-1} , correspondente aos estiramentos C – N, para estabelecer os limites de detecção da droga misturada à água e ao

plasma. Os valores encontrados foram 0,7 $\mu\text{mol/L}$ (209,55 ng/mL) e 1,39 $\mu\text{mol/L}$ (416,12 ng/mL), respectivamente [82].

Sulk e colaboradores demonstraram ser possível detectar e quantificar anfetamina e MA modificadas com 2 – ácido mercaptonicotínico utilizando um substrato de prata para obtenção de espectros SERS e Raman – com excitação em 632,8 nm. Para a determinação quantitativa foram construídas curvas de calibração utilizando ferramentas quimiométricas como PLS (partial last square). As faixas de concentração investigadas para a anfetamina e MA foram 47,2 ppm a 472 ppm e 60,9 a 2435 ppm, respectivamente e pentaclorotiofenol foi utilizado como padrão interno. Os limites de detecção encontrados foram 19 ppm para a anfetamina e 17 ppm para a MA [83].

Andreou e colaboradores estudaram uma metodologia para detectar drogas de abuso em saliva utilizando SERS em um sistema microfluídico. O dispositivo baseia-se nos gradientes de concentração das substâncias utilizadas no trabalho e suas diferentes interações ao longo de um fluxo laminar, que controla a difusão do analito, das AgNPs e do sal (LiCl) com o papel de agente agregador de partículas. Eles mapearam a área do fluxo laminar e encontraram o melhor local com a melhor interação entre as substâncias que, por sua vez, promoveu o melhor sinal SERS. O analito utilizado foi a MA e o limite de detecção foi de 10 nmol/L [16].

Uma metodologia qualitativa para a detecção de drogas de abuso em impressões digitais foi desenvolvida por Day e colaboradores. Foram utilizadas 5 (cinco) drogas: fosfato de codeína, hidrocloreto de cocaína, sulfato de anfetamina, barbital e nitrazepam, além de 5 (cinco) substâncias não controladas cujas aparências são similares às das drogas escolhidas: cafeína, aspirina,

paracetamol, amido e talco. Após um processo de dopagem dos dedos com uma quantidade não especificada de pó de cada substância depositado em uma lâmina de aço, as impressões digitais ricas em suor e oleosas (processos diferentes de preparação) foram depositadas também em lâminas de aço e avaliadas por Raman com microscópio (Renishaw) utilizando um laser com emissão em 632,8 nm. Como resultado obtido, todos os analitos foram detectados nas impressões ricas em suor e oleosas [84].

2.5 Adsorção

Considerando duas substâncias colocadas em contato, cujas interfaces podem ser sólido-gás ou sólido-líquido, pode ocorrer transferência de massa de soluto do gás ou do líquido para a superfície do sólido até o limite de sua capacidade (q), de forma que, as concentrações iniciais das soluções aquosa ou gasosa serão diferentes das concentrações finais (C_e) quando o sistema atingir o equilíbrio. Assim, o sólido é denominado de adsorvente ou substrato; os solutos das soluções gasosa e aquosa são chamados de adsorbato e todo o processo recebe o nome de adsorção. São três os mecanismos que balizam esse fenômeno, quais sejam: o estérico, o de equilíbrio e o cinético. O primeiro consiste numa adsorção seletiva do adsorbato em virtude da morfologia do adsorvente. No segundo, a adsorção ocorre segundo a afinidade de natureza química entre o adsorbato e o adsorvente. O mecanismo cinético é expresso como a taxa de transferência do adsorbato na fase fluídica para o adsorvente em relação ao tempo. Isso depende do tipo do sítio de adsorção. Os processos de adsorção têm recebido muita atenção ultimamente por oferecer respostas quanto à identificação de traços de substâncias e a separação das mesmas

contidas em solução, em fase gasosa ou aquosa, haja vista que outros métodos físico-químicos não são capazes de fazer [85].

2.5.1 A intensidade do processo de adsorção

A intensidade da interação entre o adsorbato e o adsorvente vai depender das forças envolvidas entre eles que podem ser por Fisissorção e/ou Quimissorção. No primeiro, a adsorção é fraca, uma vez que as forças de interação envolvidas entre o adsorvente e o adsorbato são tipo Van der Waals. A quimissorção envolve compartilhamento ou troca de elétrons, o que torna maior a interação entre o adsorbato e o adsorbente e, conseqüentemente, uma adsorção mais forte. É importante salientar o caráter específico das interações adsorvente/adsorbato na adsorção química, ou seja, o substrato apresenta sítios localizados e bem específicos de interação com as moléculas/íons do soluto, enquanto que na fisissorção não existe especificidade e as interações ocorrem em toda a superfície do adsorvente de forma não localizada [85].

2.5.2 Fatores que influenciam o processo de adsorção

Como todos os processos experimentais, fatores como temperatura, natureza do solvente, pH entre outros afetam o resultado. Ao estudarmos sistemas de adsorção, as propriedades do adsorvente e do adsorbato, como por exemplo a área superficial, natureza da molécula/ion, natureza e morfologia do adsorvente, entre outros, também precisam ser considerados. A área superficial do adsorvente, por exemplo, que depende do tamanho das nanopartículas, pode afetar os tipos de interações entre o adsorbato e o adsorvente. A variação de temperatura pode afetar o modo como a difusão ocorre entre as moléculas

contidas na monocamada e o adsorvente. Além disso, os resultados obtidos nos modelos construídos para estudar sistemas de adsorção, chamados de isotermas (como veremos a seguir), apresentam diferentes resultados utilizando os mesmos dados e variando a temperatura. O pH é fator determinante na variação de cargas de superfície dos adsorventes e de distribuição de espécies na superfície do adsorvente. A polaridade da molécula também influencia em sua adsorvidade. Moléculas polares têm forte afinidade por partículas metálicas e as aminas são exemplo disso [85].

2.6 Isotermas de adsorção

Isoterma de adsorção é um diagrama que tem a finalidade de compreender os processos de equilíbrio envolvidos em um sistema de adsorção em determinada temperatura. Acerca do conceito de adsorção já externado, os dados experimentais q e C podem ser relacionados permitindo a construção de um modelo matemático que informe a capacidade máxima de adsorção do sistema investigado [85] [86].

De outro modo, tomemos uma série de soluções com concentrações iniciais conhecidas (C_0) onde um volume determinado (V) de cada uma dessas soluções é adicionado à superfície de um adsorvente. Após a transferência do adsorbato para o adsorvente, um novo equilíbrio é formado e a concentração final pode ser representada por C_e , que pode ser determinada por diversas metodologias analíticas; e q , o qual pode ser obtido matematicamente. Considerando que a quantidade de adsorbato adsorvido pelo adsorvente seja igual a quantidade de adsorbato removido da solução, temos [85].

$$q = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (\text{Eq. 17})$$

onde q é a capacidade de adsorção (mg/g); C_o é a concentração inicial do adsorbato (mg/L); C_e é a concentração do adsorbato no equilíbrio (mg/L); V é o volume da solução (mL) e m é a massa do adsorvente (mg).

Uma vez conhecidas todas as variáveis, é possível elaborar um gráfico de uma isoterma de adsorção de q versus C_e como podemos observar na Figura 22.

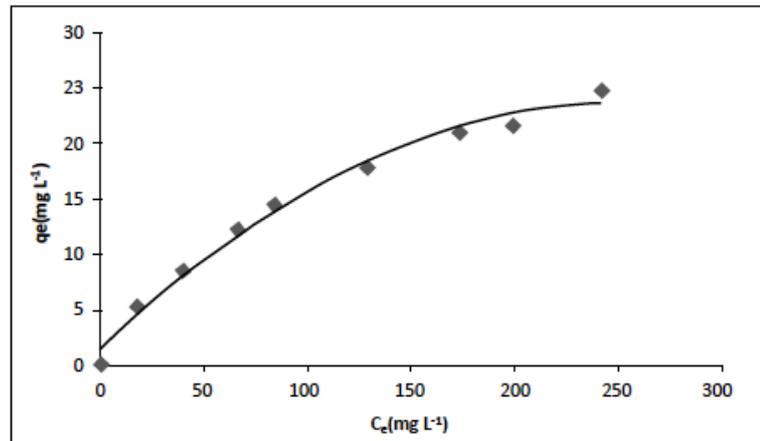


Figura 22. Representação gráfica de uma isoterma de adsorção. Retirada de [85].

As tendências das isotermas também apontam informações importantes, como por exemplo, o favorecimento ou não da adsorção de um adsorbato por um adsorvente. As formas possíveis de tendências das isotermas de adsorção podem ser observadas na Figura 23.

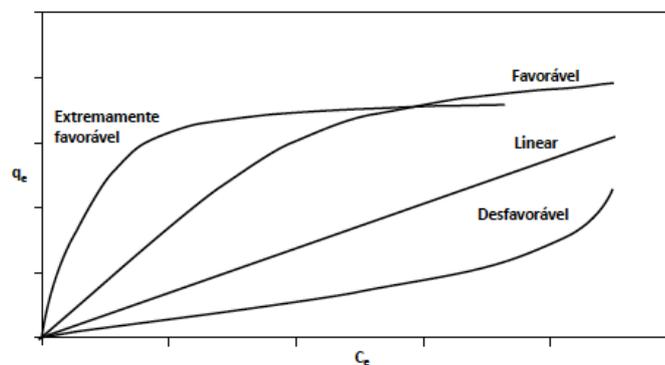


Figura 23. Tendências das isotermas de adsorção. Retirada de [85].

As tendências estão relacionadas com a massa de adsorbato adsorvida, a massa da unidade do adsorbato e a concentração do adsorbato na fase líquida. Assim, é possível estruturar a Tabela 6.

Tabela 6. Representação da relação da quantidade de massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente e tendências das isotermas (Adaptada de [87])

Tendências das isotermas.	Massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente.	Parâmetro de equilíbrio - R
Extremamente favorável / favorável	Alta para uma baixa concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida	0 < R < 1
Linear	Proporcional a concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida.	R = 1
Desfavorável	Baixa e independente da concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida	R > 1

O parâmetro de equilíbrio adimensional pode ser calculado por meio da seguinte equação:

$$R_L = \frac{1}{1 + (K \times C_0)} \quad (\text{Eq. 18})$$

Onde K representa a constante de adsorção e C_0 é a concentração inicial do adsorbato (mg/L).

Existem várias propostas de isotermas para estudar sistemas de adsorção. Neste trabalho foram utilizadas três delas: (i) Langmuir, (ii) Frumkin e (iii) Freundlich [85] [86] [87] [88].

2.6.1 Isoterma de Langmuir

A equação de Langmuir é um modelo elaborado para o estudo de sistemas contendo soluções aquosas e tem como pressupostos: número

definido de sítios com energia equivalente onde cada sítio possui apenas uma molécula adsorvida, a adsorção em monocamada e as moléculas adsorvidas não interagem entre si [85].

Para esse modelo as velocidades de adsorção e dessorção do adsorbato devem ser consideradas iguais para sítios superficiais quando o sistema atingir o equilíbrio.

Assim, a taxa de adsorção é dada por:

$$k_a = K_1 C_e (1 - \theta) \quad (\text{Eq. 20})$$

Sendo θ o grau de cobertura do adsorbato e K_1 a constante de adsorção.

E a taxa de dessorção:

$$k_d = K_2 \theta \quad (\text{Eq. 19})$$

Sendo K_2 a constante de dessorção.

Ambas as taxas se igualam no equilíbrio. Então:

$$K_1 C_e (1 - \theta) = K_2 \theta \quad (\text{Eq. 20})$$

Adota-se:

$$K_{ads} = \frac{K_1}{K_2} \quad (\text{Eq. 21})$$

Reajustando os termos da equação, tem-se para a equação de Langmuir:

$$\theta = \frac{K_{ads} C_e}{1 + K_{ads} C_e} \quad (\text{Eq. 22})$$

Para encontrar a constante de equilíbrio de adsorção, K_{ads} , pode-se utilizar a forma linearizada da equação:

$$\frac{C_e}{\theta} = C_e + \frac{1}{K} \quad (\text{Eq. 23})$$

Neste trabalho utilizou-se as duas equações acima para investigar a adsorção da MA nos substratos SERS-ativos. No intuito de determinar os valores

do recobrimento superficial, θ , foi considerada a relação I/I_0 , onde I é a intensidade SERS da MA em uma determinada concentração e I_0 a intensidade SERS da MA na condição com de formação de uma monocamada (superfície saturada).

2.6.2 Isoterma de Frumkin

O modelo de Frumkin é baseado em uma monocamada considerada não ideal, onde as moléculas adsorvidas podem interagir entre si. Além disso, assim como na isoterma de Langmuir, os sítios de adsorção possuem energia equivalente. Nesse modelo, a energia livre de adsorção é considerada uma função linear da cobertura. Dessa forma, a equação que representa o modelo da isoterma de Frumkin [85] [86] pode ser representada como:

$$\theta = \frac{K_{ads}Ce^{2g\theta}}{1+K_{ads}Ce^{2g\theta}} \quad (\text{Eq. 24})$$

onde K_{ads} representa a constante de equilíbrio de adsorção, C a concentração da solução e g é um parâmetro de interação entre as espécies adsorvidas. Para $g > 0$, a interação é atrativa e para $g < 0$ a interação é repulsiva. No caso de $g = 0$, o sistema se comporta como Langmuir.

Os valores de θ foram obtidos, no presente estudo, conforme citado no Item 2.6.1, para as isotermas de Langmuir.

2.6.3 Isoterma de Freundlich

Esse modelo corresponde a uma equação empírica, que correlaciona a entalpia de adsorção e a concentração do adsorbato de forma que, a energia de

adsorção diminui à medida em que o processo de adsorção ocorre [84] [88]. A equação é dada da seguinte forma:

$$q = KC_{eq}^{1/n} \quad (\text{Eq. 25})$$

Onde K é uma constante de proporcionalidade, pois não é derivada de condições de equilíbrio [90]. O parâmetro n é empírico e permite saber se o processo de adsorção é favorável ($1 < n < 10$).

Uma vez que a isoterma de Freundlich não se aplica a sistemas onde a quantidade de material adsorvido não varia mais com a concentração do adsorbato, a melhor forma de se avaliar se um sistema adsorvente/adsorbato segue a isoterma de Freundlich é utilizar a forma linearizada da equação:

$$\ln q_e = \ln K + \frac{1}{n} \ln C_{eq} \quad (\text{Eq. 26})$$

Neste trabalho será assumido que a intensidade SERS (I_{SERS}) guarda uma relação de proporcionalidade com a quantidade de material adsorvido na superfície do adsorvente, ou seja, $I_{SERS} = kq_e$. Portanto, na forma linearizada, pode-se dizer que:

$$\ln I_{SERS} = \ln K + \frac{1}{n} \ln C \quad (\text{Eq. 27})$$

3. Metodologia

Buscou-se no desenvolvimento deste trabalho a utilização de alguns dos princípios da química verde, a saber: a diminuição da utilização e geração de substâncias tóxicas nas rotas sintéticas; os produtos destas rotas devem prezar pela maior eficiência com menor toxicidade; os reagentes utilizados devem ser, sempre que possível, inofensivos a saúde e ao meio ambiente; a matéria prima utilizada nas rotas de síntese deve ser obtida de fontes renováveis e por fim; deve-se sempre atentar para a redução de riscos de acidentes durante o processo químico [91].

A química verde foi definida pela *International Union for Pure and Applied Chemistry* – IUPAC como: “A invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas” [92]. Então, uma proposta de síntese verde pode não apresentar toxicidade em toda a rota ou parte dela. Além disso, o descarte dos resíduos produzidos foi uma preocupação contida na escolha do processo químico deste trabalho. Essas questões são discutidas desde a Agenda 21 (capítulos 19, 20 e 30), documento elaborado durante o encontro de 179 chefes de Estado no evento ECO-92, realizado na cidade do Rio de Janeiro-RJ, em 1992 [93]. No ano anterior, a agência ambiental norte-americana *Environment Protection Agency* destinava recursos a projetos de pesquisa que englobassem rotas sintéticas não poluentes. Esse programa, denominado “*Rotas Sintéticas Alternativas para Prevenção de Poluição*”, deu início à Química Verde [94].

A aplicação da nanotecnologia tem se ampliado desde a última década, mas uma preocupação quanto ao uso deste tipo de material refere-se ao descarte. Hoje é possível encontrar nanomateriais em produtos comerciais

diversos, de eletrônicos a cosméticos. As AgNPs em geral apresentam propriedades antibacterianas e por isso, são muito estudadas na área de saúde [95] [96]. Contudo, a utilização indiscriminada de nanomateriais merece cautela. Estudos *in vitro* e *in situ* da interação entre AgNPs e células de mamíferos apontam diversas potenciais alterações nas estruturas celulares. Há uma correlação entre a dose absorvida, o tamanho das nanopartículas, a forma e o tempo de exposição (ingestão ou inalação) com os danos causados [97]. O tema é polêmico e requer mais investigações, uma vez que atualmente não se observa casos de intoxicação de seres humanos por AgNPs advindas de produtos de consumo [98]. Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias de dissolução desses resíduos gerados dando aos processos químicos de síntese de AgNPs uma denotação sustentável e consoante com as diretrizes da química verde.

Estudos demonstraram por meio da técnica de *Multi-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* – MC-ICP-MS, como AgNPs são formadas em águas naturais a partir de íons de Ag^+ na presença de matéria orgânica e se integram ao meio ambiente. A formação de isótopos de prata (^{107}Ag e ^{109}Ag), a relação entre o fracionamento desses isótopos com a incidência maior ou menor de luz solar e os revestimentos que possibilitam ou não a redução do íon são as grandes novidades apresentadas naquele estudo. Com isso, os pesquisadores esperam fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle da disseminação de nanomateriais na natureza [99].

Outro estudo propôs a metodologia de eletrofloculação para o tratamento de efluente industrial contendo AgNPs. Esse processo é baseado na aplicação de uma corrente elétrica que favorece a formação de flocos de hidróxidos

metálicos por eletrodissolução de um ânodo solúvel. Assim, o campo elétrico gerado no sistema pode retirar do efluente as AgNPs indesejáveis [100]. Como o processo é eletroquímico, ou seja, é a corrente elétrica a responsável pela formação dos flocos, observa-se aqui vantagens acerca da segurança e economia, pois não há necessidade da adição de substâncias químicas para flocular as AgNPs, como sulfato de alumínio - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ou cloreto férrico - FeCl_3 comumente utilizados para tratar efluentes nas companhias de água e abastecimento. Para ilustrar o trabalho, o autor fez uso da reação de um dos metais mais empregados nesse processo como agente coagulante, o alumínio – Al.

Em outro trabalho foram avaliadas 4 (quatro) rotas de síntese e relacionados os principais agentes redutores da prata (borohidreto de sódio e acetato de sódio) com o grau de interferência no processo de floculação, e concluiu-se que as partículas oriundas de rotas que envolviam o acetato de sódio levaram mais tempo para flocular. Como desvantagens desta metodologia foram apontados o custo relacionado com o consumo de energia para a realização do processo, a reposição periódica dos eletrodos e, para algumas situações, a solubilização do hidróxido gelatinoso formado [101].

No que pese a finalidade das AgNPs sintetizadas sejam diferentes das utilizadas no estudo apresentado de eletrofloculação, o aludido trabalho aponta um caminho e sua adaptação poderá servir como alternativa para o estabelecimento de um protocolo de tratamento dos resíduos nanoparticulados gerados na rota de síntese adotada no presente estudo.

3.1 Reagentes Químicos Utilizados

Foram utilizados nitrato de prata (AgNO_3 – FMaia); citrato de sódio tribásico - CS ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – Merck); Cloreto de sódio (NaCl – Vetec); Peróxido de hidrogênio (H_2O_2 35% v/v – Dinâmica); Hidróxido de amônio (NH_4OH 30% v/v – Vetec); Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 96% v/v – Vetec); Agarose bacteriológica (Acumedia/ Neogen); D_2O RMN 99,8%D (ACROS); Ácido Maleico 99,99% (Vetec); todos de grau analítico e sem purificação prévia. Além disso, foram utilizados água ultrapura Milli-Q (tipo I), cloridrato de metanfetamina (cedido pela Polícia Federal e cujo teor de pureza será discutido adiante) e pó preto revelador de impressões digitais (SIRCHIE).

3.2 Procedimento de limpeza de vidrarias

Antes do uso, todas as vidrarias e lâminas de vidro foram limpas de forma cuidadosa com soluções piranha. Primeiro foi utilizada solução alcalina (70% v/v NH_4OH / 30% v/v H_2O_2), por 20 min. Depois, solução ácida (70% v/v H_2SO_4 concentrado / 30% v/v de H_2O_2) também por 20 min, em seguida enxagues com água destilada, seguido de água ultrapura Milli-Q. Para a limpeza das lâminas de alumínio, o tempo de imersão na solução ácida foi reduzido para 10 minutos para evitar a formação de óxido de alumínio, o que prejudicaria a utilização destas lâminas, além da reação ser exotérmica, ou seja, muito violenta.

3.3 Síntese dos substratos SERS ativos

Diante das referências bibliográficas utilizadas para a realização deste trabalho, a particularidade de cada substrato apresentado por seus autores, os objetivos a serem alcançados e a consonância entre rota de síntese escolhida e

os apontamentos da química verde, optou-se por utilizar o substrato SERS ativo previamente descrito e utilizado por Oliveira e Rubim o qual é constituído por AgNPs dispersas em gel de agarose, depositado na superfície de uma lâmina de vidro [68]. Por meio dessa metodologia e uma adaptação que será descrita a seguir, foi possível não apenas estudar a adsorção da MA presente em soluções aquosas em concentrações diversas como também determinar a presença da droga em impressões digitais dopadas com solução de MA na concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L, como será abordado posteriormente.

Foram realizadas duas diferentes rotas sintéticas: (i) Na presença de NaCl [68] e (ii) na ausência desse sal (adaptação de [68]). Em um balão volumétrico de 100 mL, 250 mg de agarose foram adicionados a 10 mL de AgNO_3 (0,01 mol/L), previamente aquecido a 85-90°C durante 5 min, e deixado sob agitação magnética e aquecimento durante 10 min. Em seguida, 5 mL de solução de NaCl e citrato de sódio (0,01 mol/L e 0,0854 mol/L, respectivamente) foram adicionados gota a gota (aproximadamente 1 gota/s) com o auxílio de uma microbureta, e então adicionou-se mais 250 mg de agarose. A mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento durante 40 min. Na Figura 24 (a) é mostrado o sistema montado para a reação, enquanto que, na Figura 24 (b), é possível observar, por meio da ampliação do sistema montado, a indicação da formação da prata metálica pela coloração brilhante no centro da reação.

É importante destacar que após a reação, a redução dos íons de prata foi confirmada por espectroscopia Raman, a partir da presença do estiramento Ag-Cl e Ag-Ag, assinalados em aproximadamente 242 cm^{-1} , conforme será explicado posteriormente.

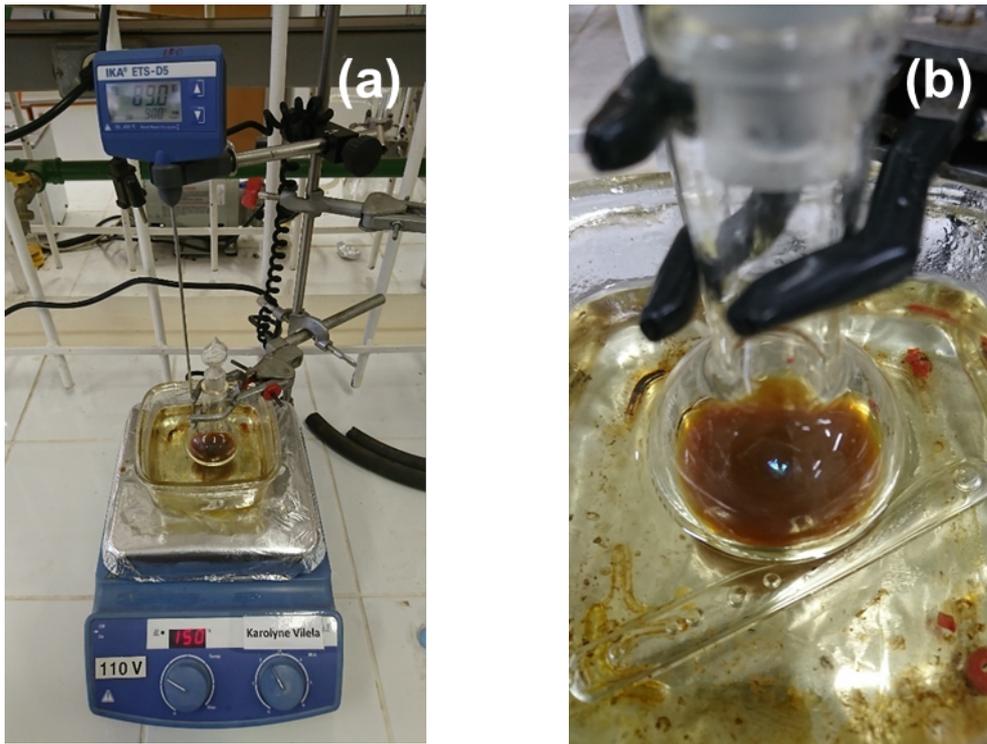


Figura 24. (a) Representação do sistema montado para a rota de síntese de AgNPs em gel de agarose e (b) ampliação da imagem do sistema montado para a reação.

Os substratos SERS ativos serão designados neste trabalho como:

- i. AgNPs(NaCl)/Agar quando obtido na presença de NaCl; e
- ii. AgNPs/Agar preparado na ausência de NaCl.

3.4 Formação dos filmes dos substratos SERS ativos

Como suporte para amparar os filmes de AgNPs(NaCl)/Agar e AgNPs/Agar, foram utilizadas lâminas de vidro 26×76 mm e 1 mm de espessura e de alumínio de dimensões 25×25 mm com cerca de 1 mm de espessura. Para as lâminas de vidro, adotou-se dividi-las ao meio para um melhor aproveitamento da quantidade de material. Em cada lâmina, foram depositadas 20 gotas da solução obtida da síntese de AgNPs/Agar pela técnica de *spin coating* (1000 rpm; 2000 rpm/s) durante um tempo de rotação de 15 s para a formação do filme

na superfície da lâmina. Logo após esse processo, as lâminas foram deixadas em repouso para secagem à temperatura ambiente, por um período de 24 h na ausência de luz. Cada rota de síntese forneceu de 11 a 13 lâminas de vidro ou de alumínio para uso. Esse processo pode ser melhor entendido visualizando a Figura 25.

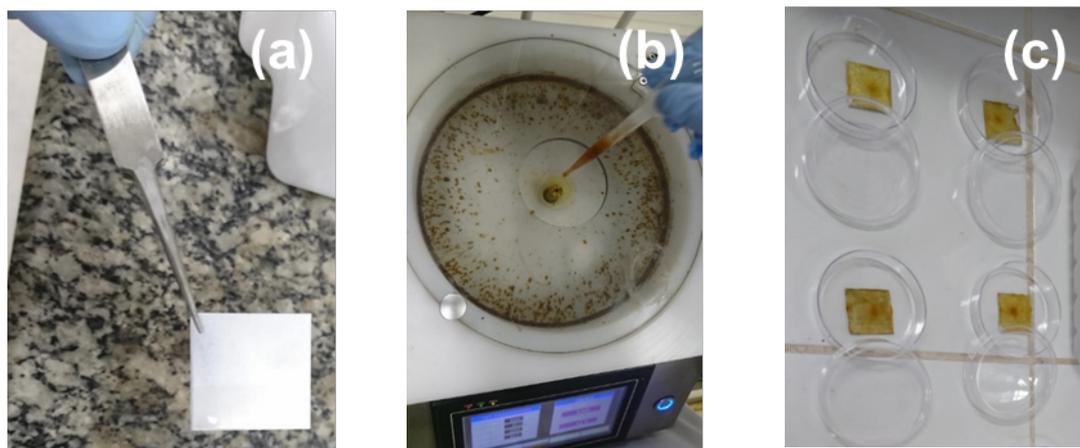


Figura 25. Etapas da deposição do filme de agarose em lâminas de alumínio. (a) Imagem da lâmina de alumínio de dimensões 25 × 25 mm. (b) Imagem da formação do filme de AgNPs/Agar/Vidro por *spin coating* a uma rotação de 1000 RPM. (c) Imagem das lâminas de vidro recobertas com filme de AgNPs/Agar acondicionadas em placas de petri.

Foi realizada a síntese para medidas do teste de branco, onde o gel de agarose processado sem a formação de AgNPs. Para isso, não foi utilizado o AgNO_3 no procedimento de síntese (Figura 26).

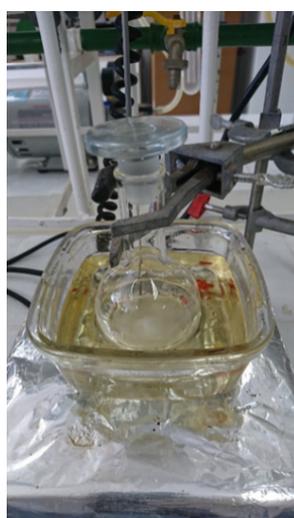


Figura 26. Gel de agarose preparado sem a adição de AgNO_3 como controle.

De acordo com a lâmina utilizada como suporte para o filme de substratos SERS ativos as nomenclaturas adotadas foram:

- i. AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro e AgNPs/Agar/Vidro preparado na lâmina de vidro; e
- ii. AgNPs(NaCl)/Agar/Al e AgNPs/Agar/Al preparado na lâmina de alumínio.

3.5 Preparação das amostras

Para o preparo de todas as soluções de cloridrato de MA foi utilizada água ultrapura Milli-Q. Foram preparadas diferentes concentrações de solução de cloridrato de MA, partindo de uma solução de estoque de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L, cujos detalhamentos encontram-se nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Descrição das concentrações das amostras utilizadas para as lâminas de vidro

Descrição	Concentração de Cloridrato de MA
Cloridrato de MA	$1,0 \times 10^{-2}$ mol/L, $7,0 \times 10^{-3}$ mol/L, $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L, $4,0 \times 10^{-3}$ mol/L, $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, $8,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $6,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $5,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $4,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L

Tabela 8. Descrição das concentrações das amostras utilizadas para as lâminas de alumínio

Descrição Lâmina	Concentração de Cloridrato de MA
AgNPs(NaCl)/Agar/Al	$6,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $4,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L
AgNPs/Agar/Al	$6,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $5,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $3,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L

Após a preparação das soluções, foram gotejados 100 μ L destas soluções em cada uma das lâminas de vidro ou de Al contendo o filme de AgNPs/Agar.

Em seguida, as lâminas foram deixadas em repouso por 24 h em temperatura ambiente. Após o repouso foram obtidos os espectros Raman.

Complementarmente, foram preparadas três lâminas com filme de agarose sem AgNPs. Adicionou-se em cada uma delas, 100 μL das soluções $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de cloreto de MA. As lâminas foram colocadas em repouso por 24 h, à temperatura ambiente. Após a secagem, foram realizadas medidas Raman.

Para ambos os tipos de lâminas (vidro e alumínio), foram realizados testes de branco. O gel formador do filme foi sintetizado sem a adição de AgNO_3 , não formando AgNPs ao final do processo. As superfícies das lâminas foram recobertas com o gel sem as AgNPs e foram então adicionados 100 μL da matriz aquosa de maior concentração ($1,0 \times 10^{-2}$ M) de adsorbato (MA). Foram deixadas em repouso para secagem por um período de 24 h e obtidos os espectros Raman.

Foram utilizadas impressões digitais produzidas pelo próprio autor deste trabalho para a preparação de lâminas contendo impressões digitais impregnadas com MA. Em uma lâmina de vidro foram depositados 100 μL da matriz aquosa de MA $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. Em seguida, o dedo polegar direito do autor foi pressionado levemente sobre a testa por 3 s para que as cristas dos desenhos digitais pudessem adquirir oleosidade. Com o mesmo dedo, pressionou-se levemente a alíquota de 100 μL sobre a lâmina de vidro por 5 s e, após retirar o dedo da lâmina, houve um período de repouso de 15 min para completa secagem à temperatura ambiente. Uma vez seco, o dedo foi pressionado sob a superfície da lâmina de alumínio recoberta com o filme AgNPs/Agar sintetizado na ausência de NaCl e obtido o espectro Raman utilizando objetivas de 20 \times e 50 \times .

3.6 Revelação da impressão digital

Para revelar a impressão digital latente produzida sobre a lâmina de AgNPs/Agar/Al foi utilizado pó preto revelador. Para a escolha do revelador foi considerada a superfície da lâmina de alumínio contendo o substrato e o tempo da impressão digital produzida. Esse revelador físico é utilizado para revelar impressões digitais latentes produzidas em superfícies lisas e aderem a umidade da impressão. Desta forma, impressões recentes produzem melhores resultados [102]. O pó preto possui em sua formulação 60% de fuligem, 25% de resina e 15% de terra de fuller. Assim, em uma folha de papel limpa foi depositada uma pequena porção de pó. Em seguida, foi passado levemente o pincel apropriado sem impregná-lo demasiadamente (removendo o excesso). Foi aplicado o pincel em movimento no sentido longitudinal em relação às linhas da impressão, quando a mesma começou a ser percebida. Por fim, procedeu-se com o registro fotográfico.

3.7 Instrumentação

As medidas SERS foram obtidas em um sistema Raman InVia (Renishaw), com um detector CCD e uma rede de difração de 1200 linhas/mm. Um microscópio Leica com objetivas de 20× e 50× foi utilizado para focalizar o feixe da radiação laser na amostra e coletar a radiação espalhada. A resolução espectral nominal foi 6 cm^{-1} . O laser de excitação utilizado foi o de HeNe (Renishaw) com emissão em 632,8 nm. Os números de onda foram calibrados utilizando uma pastilha de Si. Foram utilizadas as potências de laser correspondentes a 10% e 50% (para medidas das matrizes aquosas nas

lâminas) do laser (potência nominal de 30 mW), de acordo com a objetiva utilizada (50× e 20×, respectivamente) e 10% (para medidas das impressões digitais aplicadas nas lâminas) do laser, para ambas objetivas, variando o tempo de integração, de 6 para 8 s, respectivamente.

As medidas Raman de todas as amostras (substratos SERS-ativos) foram realizadas na faixa espectral de 100 a 1800 cm^{-1} utilizando o procedimento de mapeamento superficial de modo a se registrar um total de 100 espectros por medida utilizando a função *mapping* do equipamento, com exceção das medidas nas lâminas AgNPs(NaCl)/Agar/Al, centradas em 1300 cm^{-1} . Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Os 100 espectros foram adquiridos em intervalos de 2 μm , resultando em uma área varrida de 20 × 20 μm para a objetiva de 50×; e intervalos de 5 μm resultando numa área varrida de 50 × 50 μm para a objetiva de 20×.

Os espectros na região do UV-Vis (200 a 800 nm) foram adquiridos em um espectrofotômetro UV-Vis 2450 (Shimadzu), utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

O espectro de RMN¹H foi obtido em equipamento Avance III HD 600 MHz (Bruker), 14,1 T. A MA foi solubilizada em D₂O. Os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm (partes por milhão), assumindo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os dados espectroscópicos referentes aos sinais de RMN¹H foram organizados segundo a convenção: δ (deslocamento químico), s (singleto), d (duplete), q (quadruplete), st (sexteto) e m (multiplete).

As eletromicrografias das AgNPs/Agar sintetizadas na presença ou na ausência de NaCl foram adquiridas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (Jeol).

Os equipamentos de espectroscopia Raman, e o UV/Vis encontram-se alocados no Laboratório de Materiais e Combustíveis do Instituto de Química da Universidade de Brasília, o RMN encontra-se na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, enquanto que o Microscópio Eletrônico de Transmissão encontra-se no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

3.8 Preparação das amostras para caracterização

3.8.1 Substratos SERS ativos

A caracterização das AgNPs/Agar foi realizada por meio de análises no Microscópio de Transmissão Eletrônica (MET), sob tensão de aceleração máxima em 200 kV, Resolução: 0,23 nm (ponto) e 0,14 nm (rede). Foi diluído 0,05 mL do gel AgNPs/Agar em 2 mL de água Mili-Q ultrapura. Em seguida uma gota da solução foi depositada em um grid de cobre, da Spi Supplies, com 200 grades, deixado em repouso à temperatura ambiente por 24 horas, para posterior aquisição das micrografias.

As medidas de UV-Vis para o substrato realizadas utilizando as lâminas de vidro, pois essas permitiram a passagem da radiação ultravioleta através do vidro. As lâminas recobertas com o filme de AgNPs/Agar foram submetidas diretamente ao equipamento para a realização das medidas.

3.8.2 Metanfetamina

Os espectros de absorção no UV-Vis da MA foram obtidos utilizando uma alíquota de 2 mL de uma solução estoque na concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L inserida diretamente na cubeta com o mesmo volume e levado ao equipamento para a realização das medidas.

Para a caracterização por meio de RMN¹H, foram adicionados 8,0 mg de ácido maleico 99,99% ao tubo de ressonância, onde previamente foram adicionados 7,99 mg de MA solubilizada em D₂O.

Para caracterização da MA por espectroscopia Raman, uma pequena quantidade de amostra dos cristais de MA (cloridrato) foi retirada de um frasco com ajuda de uma espátula sendo colocada sobre uma lâmina de vidro. As medidas foram realizadas em um único ponto da amostra com o foco do feixe da radiação laser orientado pela objetiva de 50x.

3.9 Acompanhamento dos sítios SERS-ativos ao longo do tempo

Foi realizado o acompanhamento da atividade dos sítios SERS do substrato ao longo do tempo. Periodicamente foram realizadas medidas em uma mesma lâmina de vidro recoberta com AgNPs/Agar para verificar a constância da intensidade do sinal das AgNPs por meio dos espectros obtidos.

3.10 Softwares utilizados

O acompanhamento das medidas Raman bem como o mapeamento dos espectros medidos, foram realizados por meio do programa que acompanha o equipamento da Renishaw *Windows-based Raman Environment - Wire 3.3*. O processamento dos espectros para a retirada de eventuais raios cósmicos foi realizado pela ferramenta *Cosmic Ray Remover*, enquanto que a conversão dos arquivos para SPC e a extração dos mesmos foram realizadas pelos programas *Converter* e *Grams*, respectivamente. A tabulação dos dados para a elaboração dos gráficos relacionados à caracterização da MA e das AgNPs por UV/Vis, bem como o cálculo de frequências de distribuição de tamanho das AgNPs foram

realizadas utilizando o programa *Excel* da *Microsoft*, versão 2013. A contagem para determinação dos diâmetros secos das AgNPs foi feita com o auxílio do software *ImageJ*, versão 1.48. As intensidades médias dos picos em 1001 cm^{-1} foram obtidas pelo *Opus*. Os histogramas de distribuição das AgNPs e gráficos das isotermas foram confeccionados utilizando o software *OriginPro* 8. O mapa em 3 (três) dimensões dos espectros SERS / área varrida, bem como a escolha dos espectros para apresentação neste trabalho foram realizados também utilizando o software *Grams*.

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização dos substratos SERS ativos

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Como destacado na metodologia descrita neste trabalho, dois tipos de síntese de AgNPs em gel de agarose foram utilizadas. As eletromicrografias por MET obtidas para as AgNPs(NaCl)/Agar e AgNPs/Agar e seus respectivos histogramas elaborados a partir de populações de 300 partículas são apresentados na Figura 27. Os dados mostram que as AgNPs(NaCl) e AgNPs apresentam diâmetros médios de $13,8 \pm 6,9$ nm e $13,5 \pm 3,6$ nm e R^2 , indicando o ajuste da curva gaussiana às frequências de distribuição de diâmetros, igual a 0,91 e 0,97, respectivamente. Quanto à morfologia, em ambos os casos predomina a morfologia esférica. O diâmetro médio obtido para AgNPs(NaCl)/Agar, apresentou valor inferior ao obtido por Oliveira e Rubim, de $18,7 \pm 0,3$ nm, mas considerando a polidispersão observada os valores podem ser considerados próximos [68].

Bae e colaboradores afirmaram que a presença de íons cloreto promove a redução do tamanho das AgNPs, embora aumente a agregação, como observado neste trabalho, o que pode ter dificultado o cálculo do tamanho médio e justificar a magnitude do erro encontrado para as NPs obtidas na síntese com NaCl [103]. Nota-se que nas eletromicrografias obtidas por MET da Figura 27 é destacada com um círculo vermelho a presença de agregados de duas ou mais partículas de AgNPs os quais se configuram como potenciais “hot spots” para o efeito SERS, conforme indicado por Michaels e colaboradores, que afirmaram que a atividade SERS é dependente da distância entre as partículas agregadas [74].

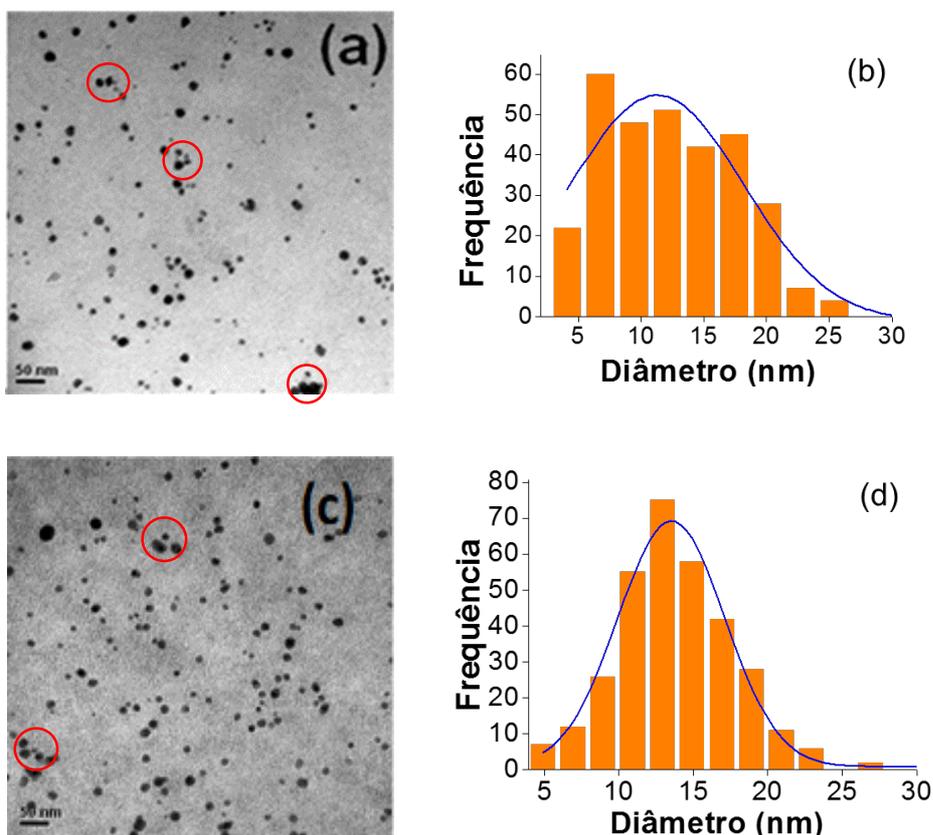


Figura 27. Eletromicrografias obtidas por MET das AgNPs(NaCl)/Agar (a) e AgNPs/Agar (c). Os círculos em vermelho destacam alguns agregados de AgNPs. Os histogramas correspondentes são apresentados em (b) e (d).

4.1.2 UV-Vis

Os espectros de absorção por UV-Vis dos filmes de AgNPs/Agar sintetizados na presença ou na ausência de NaCl podem ser observados nas Figuras 28 e 29, respectivamente. O pico de máximo de absorção para as AgNPs/Agar encontra-se em 430,5 nm para a síntese na presença de NaCl e 426,5 nm para a síntese na ausência de NaCl, sendo esse deslocamento compatível com a diferença entre o diâmetro médio das AgNPs. Observa-se na literatura a absorção do plasmon superficial das AgNPs com um máximo em 400 a 430 nm, a depender do diâmetro das NPs, valores próximos aos obtidos para ambas as sínteses neste trabalho [68] [104]. Além disso, a largura das bandas observadas nas Figuras 28 e 29 pode ser atribuída a polidispersão das AgNPs

[104]. É possível observar também no espectro da Figura 28 uma estrutura de fraca intensidade e alargada próximo a 550 nm, possivelmente indicando a presença de maior quantidade de agregados em relação à amostra cujos resultados são apresentados na Figura 29, referente à síntese na ausência de NaCl [103].

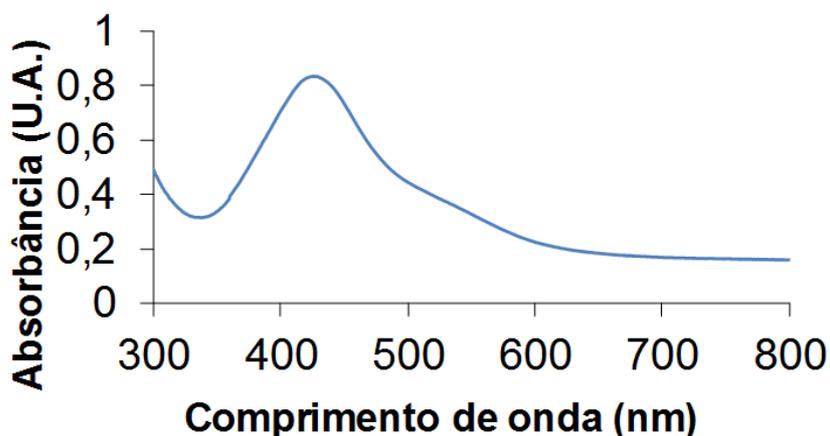


Figura 28. Espectro UV-Vis do filme AgNPs(NaCl)/Ágar/Vidro.

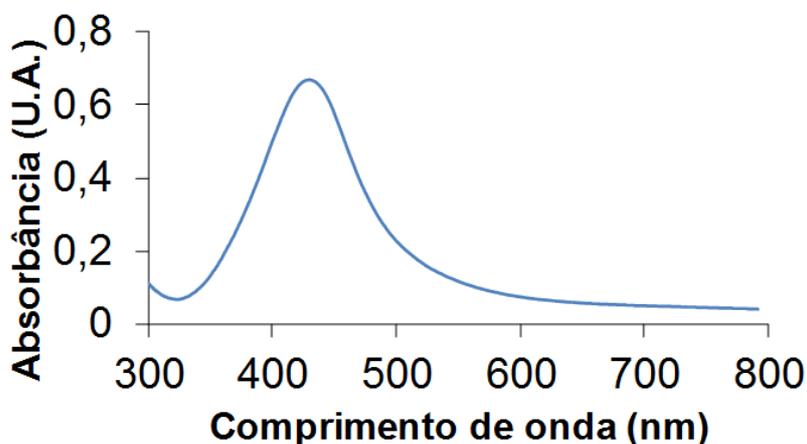


Figura 29. Espectro UV/Vis do filme AgNPs/Ágar/Vidro.

Conforme demonstrado na literatura, o tamanho das AgNPs pode ser estimado pelo deslocamento do pico característico da prata metálica. Quanto maiores as AgNPs, maior o deslocamento do máximo de absorção para a região do vermelho [105]. Por outro lado, há que se considerar também o fato de que a

presença de adsorbatos, como no caso da síntese na presença de cloreto de sódio, o máximo de absorção das LSPR desloca-se para o vermelho em função da alteração na constante dielétrica [106].

4.2 Caracterização da MA

A compreensão dos espectros de compostos puros e a caracterização de suas bandas espectroscópicas mais relevantes são de suma importância para o estabelecimento dos protocolos de exame pericial para identificação de drogas. Além disso, permite classificar as substâncias conforme as eventuais variações ocorridas na molécula original, que, por vezes são consideradas lícitas.

As amostras de MA utilizadas neste trabalho foram obtidas formalmente no Instituto de Nacional de Criminalística da Polícia Federal. Referem-se a um padrão de MA, com teor de pureza determinado por RMN¹H, apresentado nesta seção.

4.2.1 UV-Vis

O espectro de absorção no UV-Vis de uma solução de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L de MA é apresentado na Figura 30, com máximo de absorção em 266 nm, consoante com o estudo de Noggle e colaboradores, que atribui o máximo de absorção da MA na região de ca. 260 nm [107].

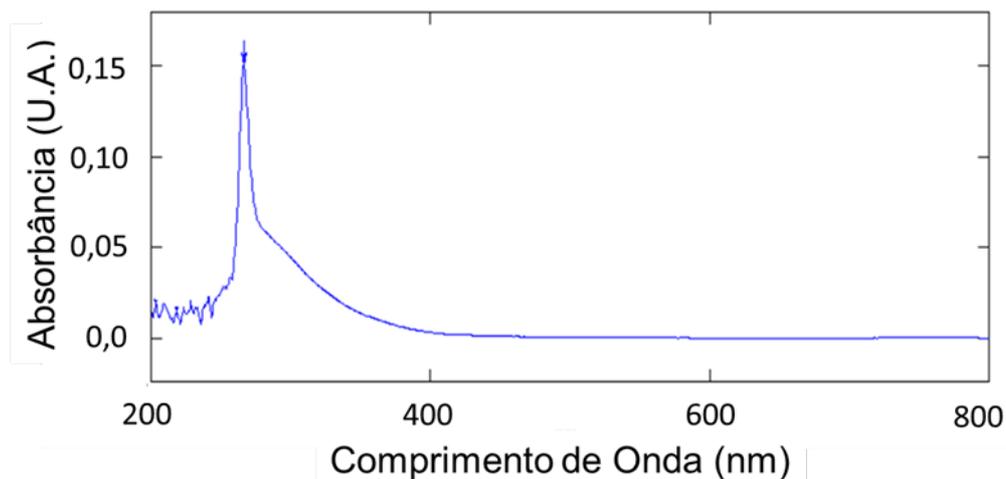


Figura 30. Espectro de absorção no UV-Vis para amostra de cloridrato de MA $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

4.2.2 RMN¹H da MA

Os resultados obtidos para esta amostra por RMN¹H encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados obtidos por RMN¹H da amostra de MA

	% CRM	mw	m(mg)	H (no H)	ppm	Integral			
Ácido Maleico Code	99,99%	116,07	8	2	6,2	100			
		% CRM	mw	M (mg)	H (no H)	ppm	mPI (mg)	Integral	Pureza
Metanfetamina	06/09/2016	C ₁₀ H ₁₆ NCl	185,7	7,99	1	3,54	15,37	16,137	99,32

O espectro de RMN¹H obtido para amostra de MA e suas respectivas atribuições podem ser observadas na Figura 31 e encontram-se compatíveis com as atribuições constantes no estudo de Cantrell e colaboradores [108].

Os deslocamentos químicos observados para o RMN¹H (600 MHz, D₂O) foram: δ : 7,44 – 7,31 (m); 3,54 (st); 3,07 (q); 2,90 (q); 1,27 (d). Nessa análise foi obtido teor de 99,3% de pureza. Este teor de analito em sua matriz pode ser obtido considerando as integrais de picos do ácido maleico e MA e dividindo-as por suas respectivas massas, segundo a equação:

$$P_x = A_x / A_{PI} \times N_{PI} / N_x \times M_x / M_{PI} \times m_{PI} / m \times P_{PI} \text{ (Eq. 28)}$$

na qual: PI = padrão interno de pureza conhecida x = analito; P = pureza ; A = área do sinal de ressonância; N = número de núcleos que absorvem na frequência do sinal de ressonância; M = massa molar; m = massa de amostra [109].

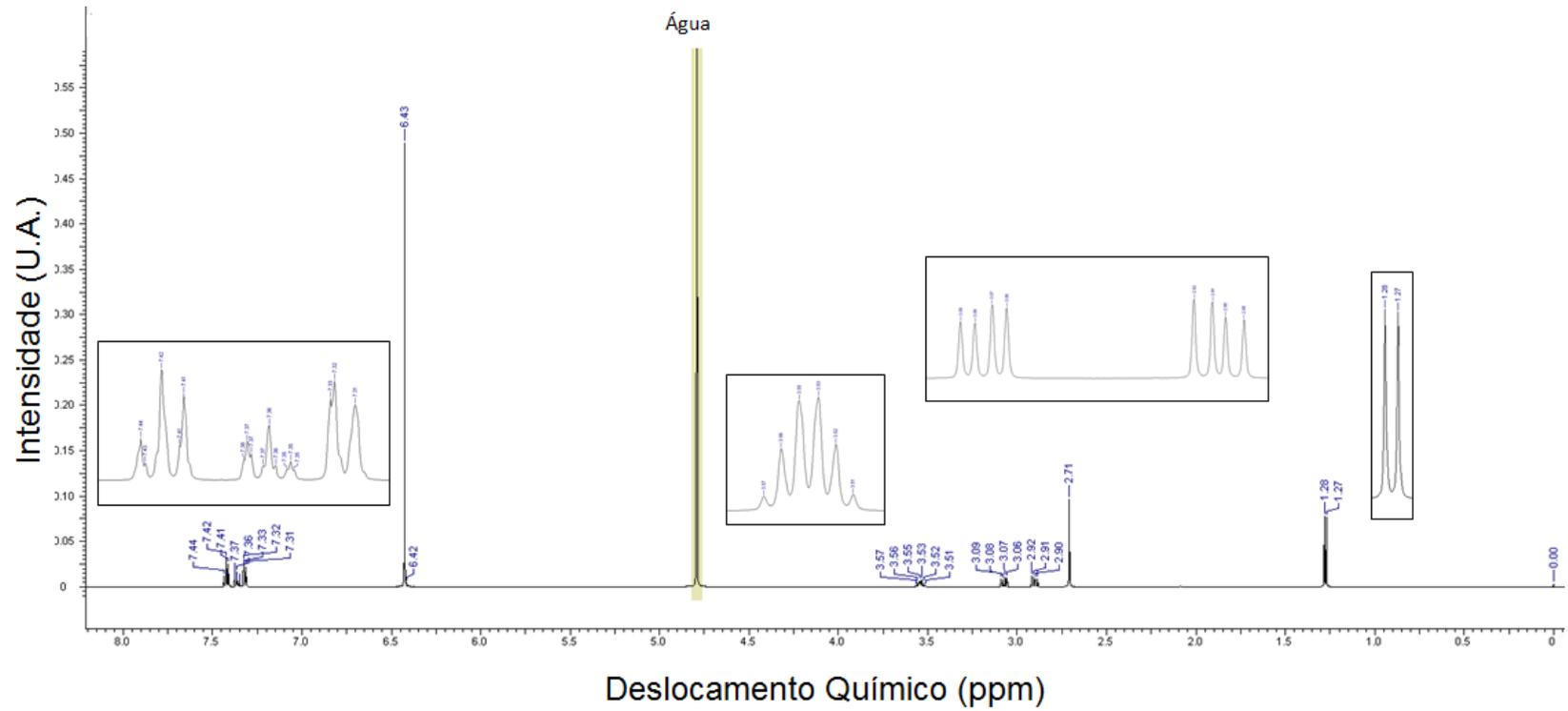


Figura 31. RMN¹H da amostra de cloridrato de MA, onde são representados os deslocamentos químicos referentes a cada hidrogênio da molécula. Os retângulos representam a ampliação para melhor visualização das atribuições.

4.2.3 Espectro Raman da MA

O espectro Raman obtido para a amostra de cristais de cloridrato de MA é apresentado na Figura 32. Podem ser observadas as bandas características da MA, com destaque para a intensa banda próxima a 1000 cm^{-1} .

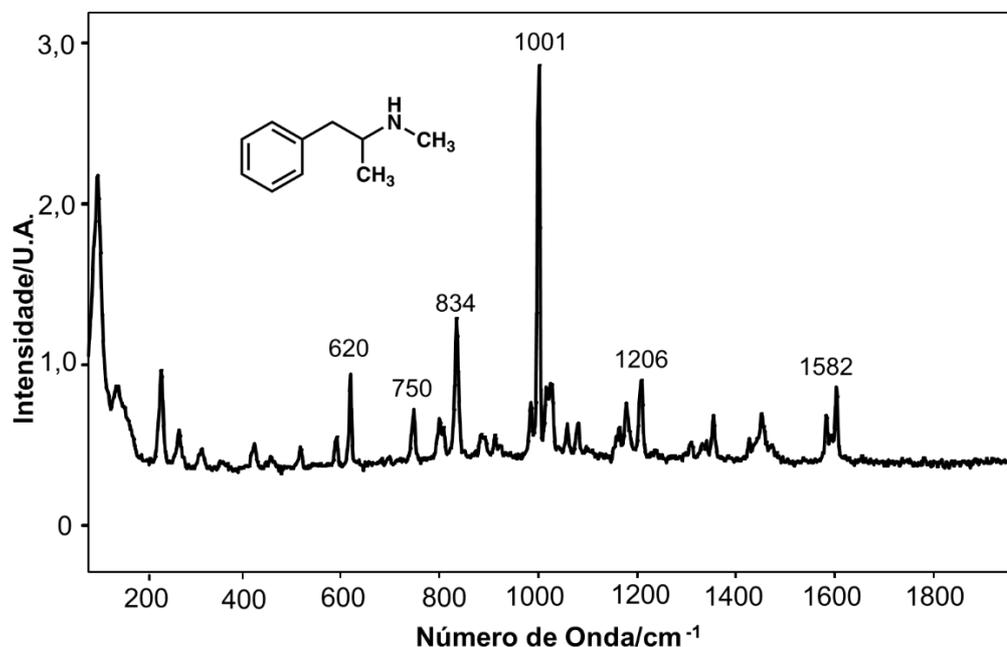


Figura 32. Espectro Raman da amostra de cristais de cloridrato de MA.

A Tabela 10 apresenta as atribuições vibracionais, segundo a notação de Wilson para o anel benzênico na molécula de MA, conforme indicado na Figura 32 [110]. Como pode ser observado, o espectro Raman obtido (Figura 32) é coerente com outro estudo publicado para esta droga, com a banda em ca. 1000 cm^{-1} atribuída ao modo de respiração do anel na estrutura do anel benzenico monosubstituído [111].

Tabela 10. Sinais Raman observados no espectro da MA e atribuições vibracional tentativa

$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Atribuição vibracional tentativa
620	6a (estiramento do anel)
750	4 (deformação do anel fora do plano)
834	10a (deformação do CH fora do plano)
1001(100)	1 (respiração do anel)
1206	9a (deformação do CH no plano)
1582	8b (estiramento C=C)

4.3 Medidas Raman do substrato SERS na lâmina de vidro para detecção de MA

4.3.1 AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro

O espectro Raman do substrato AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro é mostrado na Figura 33. Observa-se um sinal intenso em ca. 243 cm^{-1} , que pode ser atribuído ao estiramento Ag-Cl [68].

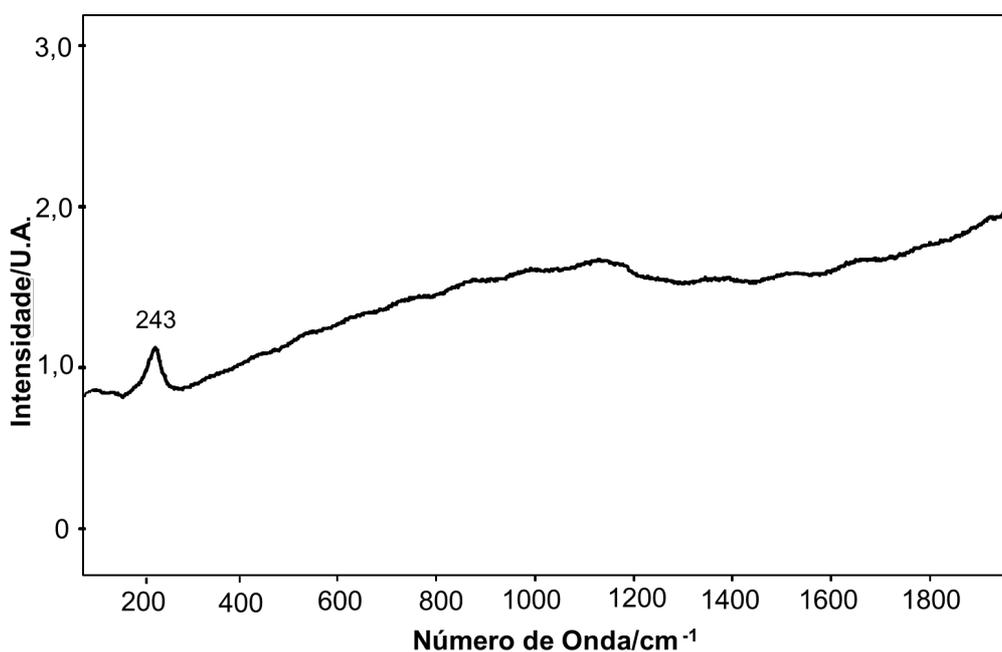


Figura 33. Espectro Raman do substrato AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro. Objetiva 50 x.

Um espectro SERS representativo de uma solução $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de MA depositada sobre a superfície do substrato AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro é apresentado na Figura 34.

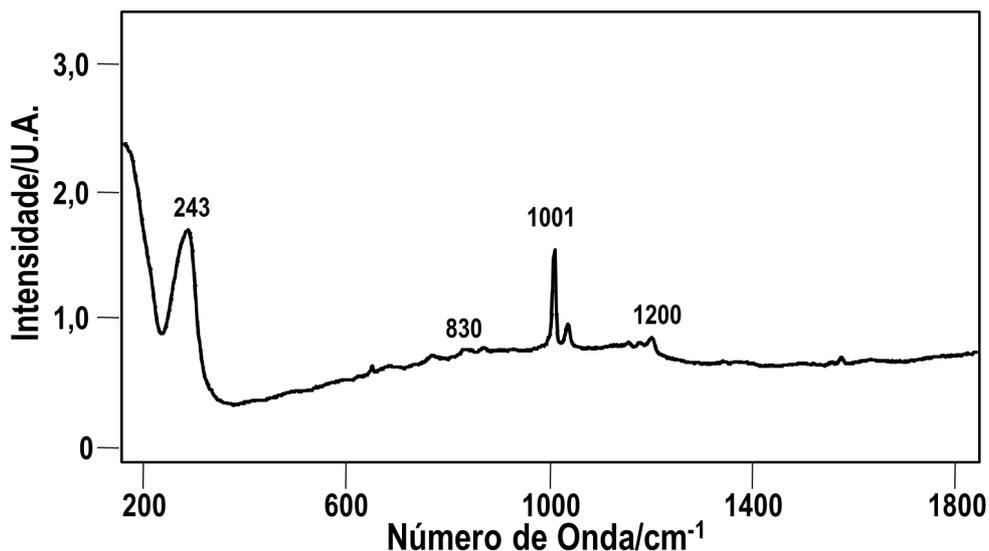


Figura 34. Espectro SERS de uma solução $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de cloridrato de MA depositada (100 μ L) sobre AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro. Objetiva 50 \times .

Observa-se na Figura 34 as bandas relativas à MA (ca. 830, 1000 e 1200 cm^{-1}), além da banda em cerca de 240 cm^{-1} , atribuídas em conformidade com o encontrado na literatura [111].

É importante destacar que o cloridrato de MA em solução se apresenta na forma catiônica e irá interagir com íons cloreto sob a constituição de par iônico.

A Figura 35 mostra uma representação 3D de um conjunto de 100 espectros que constitui uma réplica onde é possível observar que, mesmo em baixas concentrações ($5,5 \times 10^{-3}$ mol/L), a maioria dos espectros apresenta picos característicos da MA.

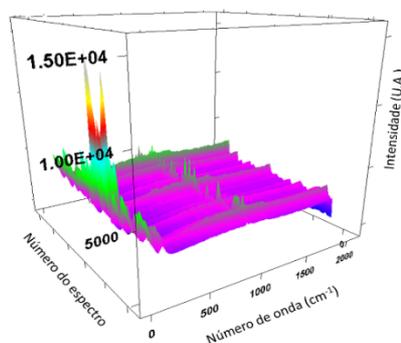


Figura 35. Representação 3D de 100 espectros correspondentes a amostra com concentração de $5,5 \times 10^{-3}$ mol/L de MA.

As Figuras 36 e 37 representam as médias dos espectros Raman medidos em triplicata, com cada réplica contendo 100 (cem) medidas em cada área escolhida na superfície da lâmina de vidro, recoberta com o filme AgNPs(NaCl)/Agar contendo soluções de cloridrato de MA, em diferentes concentrações, para as objetivas de 50× e 20×, respectivamente.

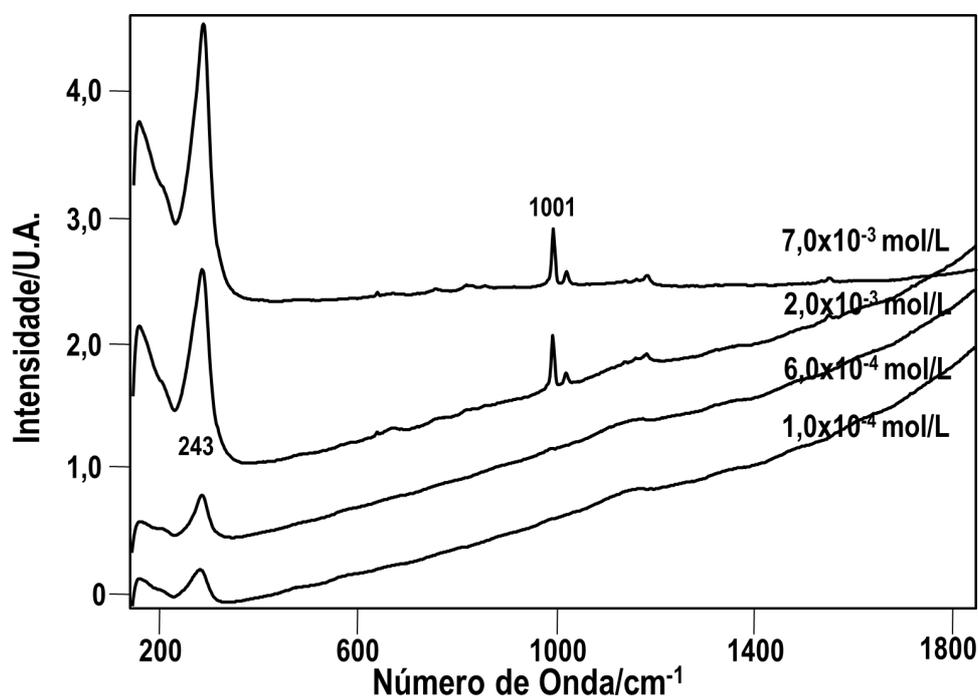


Figura 36. Espectros SERS das lâminas de vidro AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações, objetiva de 20×.

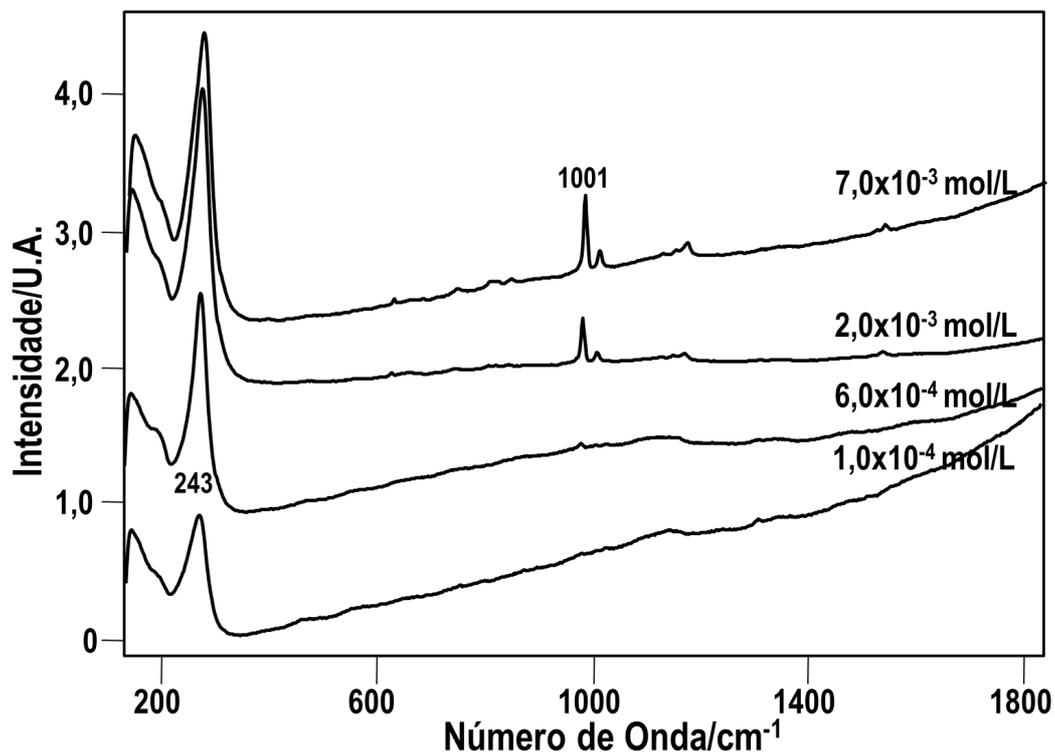


Figura 37. Espectros SERS das lâminas de vidro AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações, objetiva de 50 \times .

Conforme pode ser observado nas Figuras 36 e 37, a variação da intensidade do pico localizado em 1001 cm^{-1} não apresenta uma resposta proporcional à variação nas concentrações das matrizes aquosas utilizadas (MA), o que torna difícil a utilização deste sistema para determinações quantitativas, embora ainda possa ser uma alternativa para a determinação qualitativa da droga em estudo. É possível observar ainda uma alta relação sinal/ruído para os espectros. Um aumento no número de medidas poderia melhorar essa relação, mas o tempo de aquisição dificultaria ou até mesmo tornaria proibitiva a aplicação da técnica na prática pericial.

4.3.2 AgNPs/Agar/Vidro

É importante destacar que não foi possível realizar medidas que viabilizassem a detecção de MA nas lâminas de vidro com as AgNPs/Agar da síntese na ausência de NaCl. Os espectros SERS apresentaram uma intensidade de fundo (*background*) muito alta. Embora o procedimento adotado para o depósito do filme de AgNPs/Agar fosse o mesmo utilizado anteriormente, a explicação possível para essa observação foi a falha no sistema confocal do equipamento. De fato, no período da realização desses experimentos houve um problema técnico no sistema confocal. Desta forma, o sistema de coleta da radiação espalhada acabava registrando a luz espalhada pela lâmina de vidro, logo abaixo do filme, levando assim a um aumento considerável da intensidade de fundo. Como será visto mais adiante, esse problema foi contornado utilizando-se uma lâmina de alumínio para o depósito dos filmes de AgNPs(NaCl)/Agar e AgNPs/Agar.

4.3.3 Agar/Vidro

O espectro Raman correspondente à média dos espectros Raman (100 medidas) para uma lâmina recoberta com filme de gel de agarose sem a adição de prata e 0,3 mL de solução $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de MA (teste em branco) é apresentado na Figura 38.

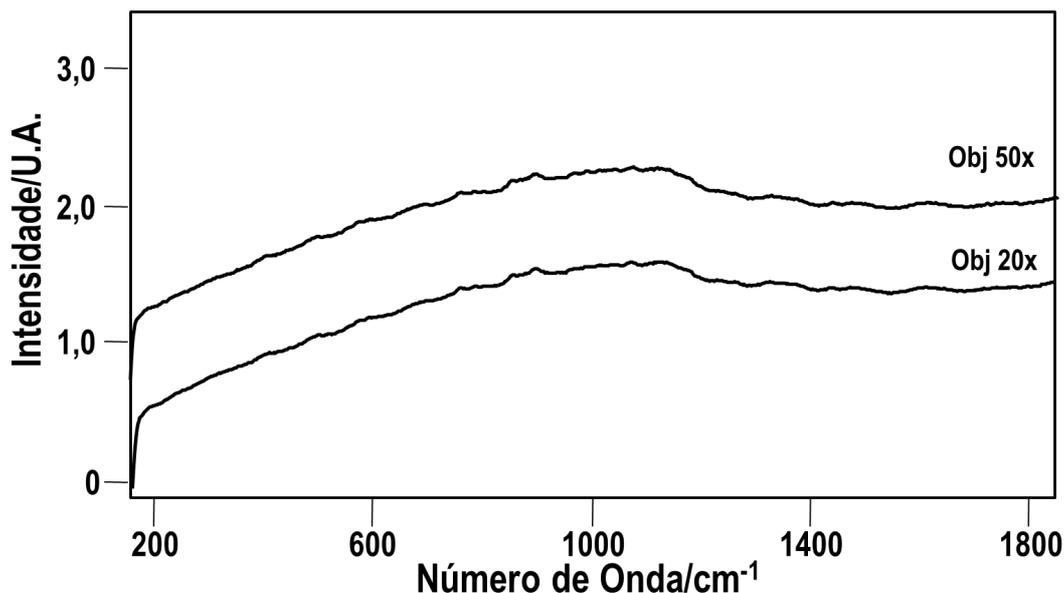


Figura 38. Espectros Raman da lâmina de vidro recoberta com gel de agarose sem prata, gotejada com solução de cloridrato de MA $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L.

Na Figura 38 não são detectados sinais referentes à molécula de MA (em 1001 cm^{-1}) que pudessem apontar a presença desta molécula na superfície da lâmina de vidro. Portanto, pode-se inferir que os sinais Raman da MA observados para o filme de AgNPs/Ágar nas lâminas de vidro (Figuras 36 e 37) foram possíveis mediante efeito SERS.

4.3.4 Estabilidade do filme de AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro

Apesar de alguns resultados insatisfatórios obtidos com as lâminas de vidro, as medidas qualitativas para verificar a presença de prata no filme de AgNPs(NaCl)/Agar ao longo do tempo apontaram para uma estabilidade do substrato por mais de 6 meses, conforme pode ser observado na Figura 39.

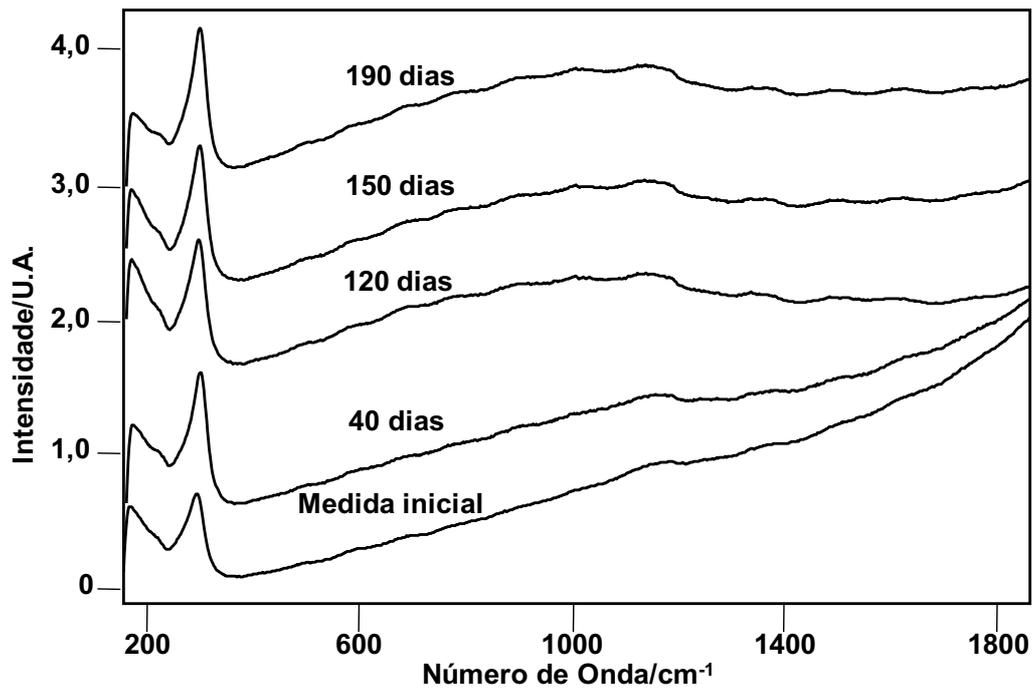


Figura 39. Espectros Raman, obtidos nas datas indicadas, da lâmina AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro. Objetiva de 50 \times .

4.4 Medidas Raman do substrato SERS na lâmina de alumínio para detecção de MA

4.4.1 AgNPs(NaCl)/Agar/Al

Os espectros SERS da MA adsorvida em filme de AgNPs(NaCl)/Agar depositado sobre lâmina de Al são apresentados nas Figuras 40 e 41, para as objetivas de 20 \times e 50 \times , respectivamente. Para a objetiva de 50 \times foi varrida uma área de (20 \times 20) μm e para a objetiva de 20 \times a área varrida foi de (50 \times 50) μm .

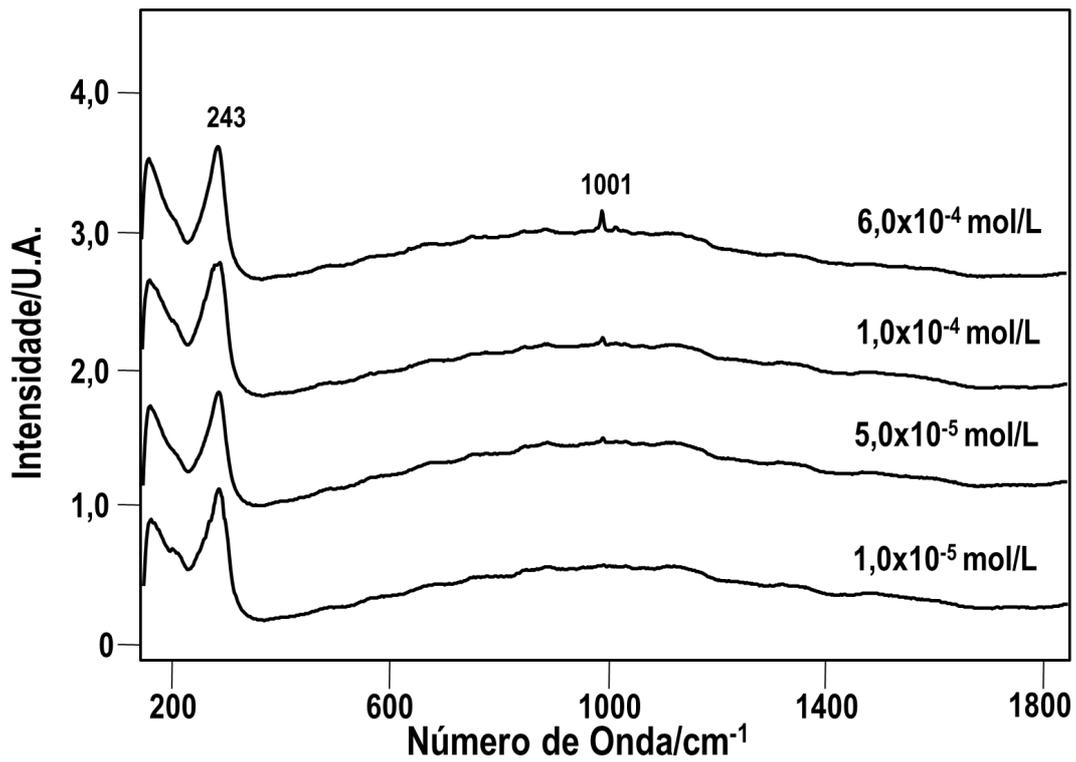


Figura 40. Espectros SERS das lâminas AgNPs(NaCl)/Agar/Al com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações. Objetiva de 20x.

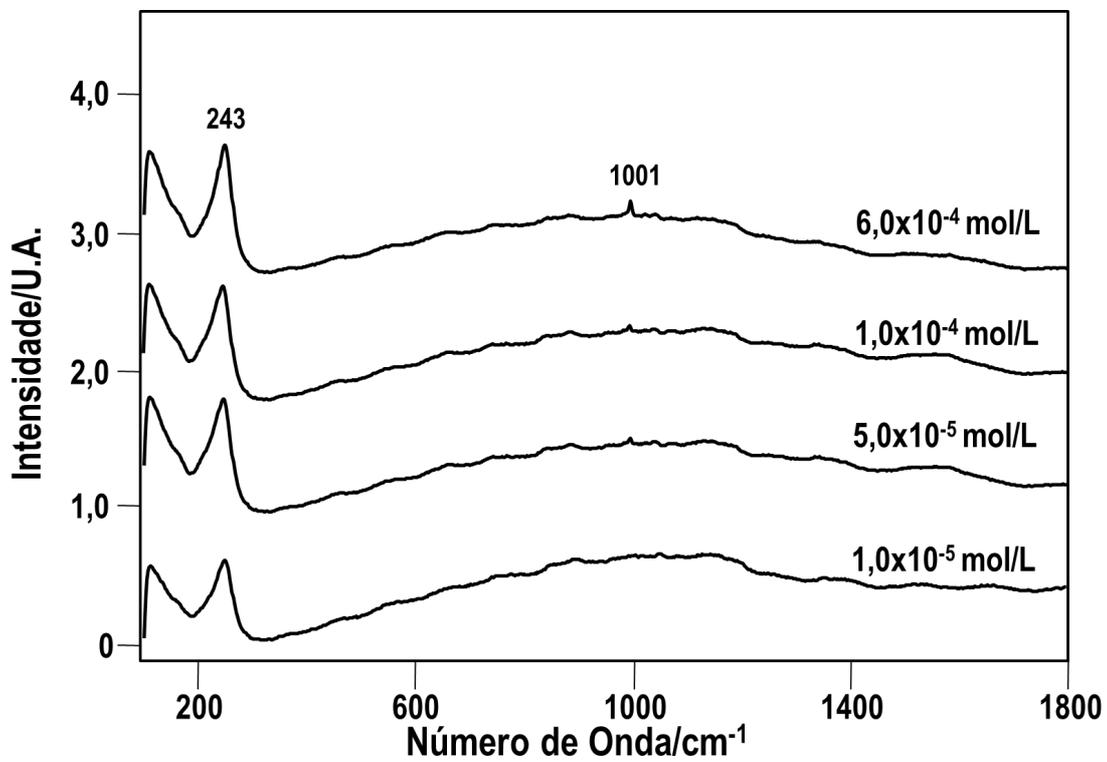


Figura 41. Espectros SERS das lâminas AgNPs(NaCl)/gar/Al com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações. Objetiva de 50x.

Conforme pode ser observado nas Figuras 40 e 41 há uma variação proporcional da intensidade do sinal Raman em 1001 cm^{-1} dependente das concentrações de cloridrato de MA aplicadas. Observou-se nos espectros SERS que, acima de uma determinada concentração ($6,0 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$), as intensidades dos picos se tornaram praticamente constantes (ver Figura 45). Este fato pode ser atribuído à formação de uma monocamada da molécula de MA na superfície do filme de AgNPs/Agar com preenchimento gradual dos sítios SERS ativos. As AgNPs sintetizadas em gel de agarose apresentam-se confinadas na fase gel-sólido. Essa restrição de movimento das AgNPs possibilita a irradiação de uma maior quantidade de sítios SERS-ativos pela radiação laser excitante, sendo esse tipo de substrato de interesse potencial para utilização em determinações diretas a partir de impressões digitais.

Para o processo de adsorção da MA em concentrações abaixo de $1,0 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$, apenas uma pequena parte da superfície está recoberta por moléculas da droga. Desta forma, alguns espectros apresentam-se como eventos nulos para o sinal da MA. Poder-se-ia argumentar que o evento nulo se deve a ausência de atividade SERS no sítio medido. No entanto, em todos os espectros registrados observa-se o sinal característico para atividade SERS em AgNPs em *ca.* 240 cm^{-1} , demonstrando assim a ausência da molécula nestas regiões de eventos nulos. Ao estudar o comportamento de adsorção de corantes, no substrato SERS também utilizado neste trabalho, AgNPs(NaCl)/Agar/Vidro, Oliveira e Rubim detectaram Rodamina 6G, a uma concentração em *ca.* $1,0 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$. Os autores observaram estes eventos nulos e atribuíram a locais sem a molécula do corante adsorvida [68].

4.4.2 AgNPs/Agar/Al

Os espectros SERS da MA adsorvida em filme de AgNPs/Agar depositado sobre lâmina de alumínio são apresentados nas Figura 42 e 43, onde foram utilizadas objetivas de 20× e 50×, respectivamente.

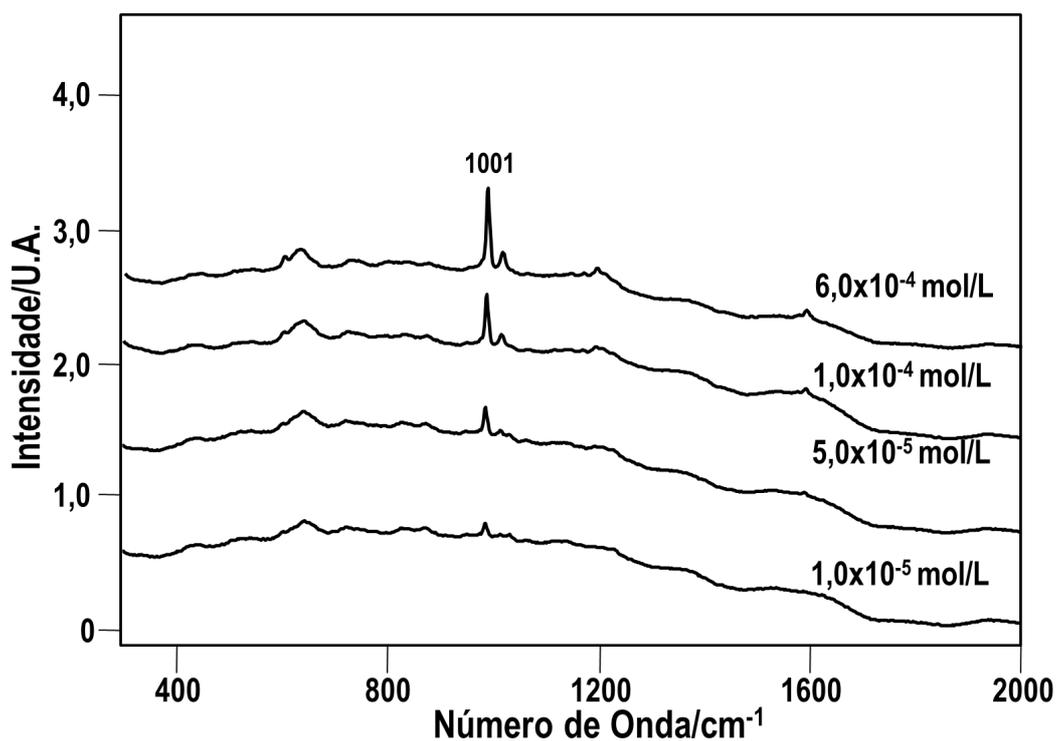


Figura 42. Espectros SERS das lâminas AgNPs/Agar/Al com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações. Objetiva de 20×.

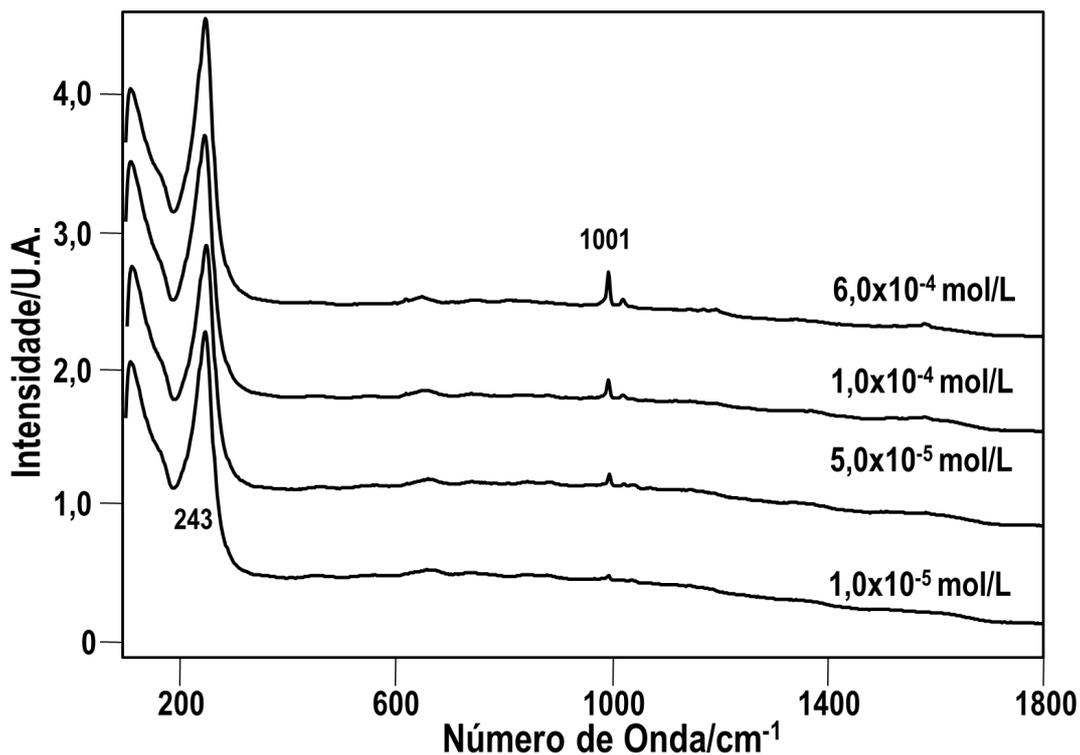


Figura 43. Espectros SERS das lâminas AgNPs/Agar/Al com amostras de cloridrato de MA em diferentes concentrações. Objetiva de 50 \times .

Observou-se nos espectros SERS das lâminas de alumínio obtidas pela síntese na ausência de NaCl, um comportamento similar ao verificado nas lâminas preparadas na síntese com NaCl, particularmente no que se refere às concentrações maiores que $6,0 \times 10^{-4}$ mol/L, onde não há variação das intensidades do pico em 1001 cm^{-1} proporcional à variação da concentração das amostras contendo o analito. Assim, concentrações maiores que as relacionadas à formação da monocamada, remetem a espectros com sinais Raman com intensidade relativamente constante, ou seja, não há variação significativa da intensidade do sinal.

Com relação às concentrações mais baixas, foi observado sinal até $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Também é possível observar uma melhor relação sinal/ruído e uma maior intensidade dos picos na região de 1001 cm^{-1} entre os espectros da

MA adsorvida no filme de AgNP/Agar/Al, quando comparados aos espectros da droga adsorvida em substrato sintetizado na presença de NaCl.

Os espectros da Figura 42 não apresentam a região do espectro correspondente ao pico característico da prata, pois na melhor relação sinal ruído e intensidade para a objetiva de 20× havia saturação do sinal no detector. Desta forma optou-se pela supressão dessa região dos espectros da objetiva de 20× para as medidas nas lâminas de alumínio recobertas com filme de AgNPs/Agar na ausência de NaCl. Ainda com relação ao sinal SERS em 240 cm^{-1} , provavelmente este sinal se deve à contribuição de dois modos vibracionais, o estiramento Ag-Ag (observado na Figura 43) e o estiramento Ag-Cl, uma vez a ao se adicionar MA, existe a presença de cloreto na superfície. Esse fenômeno é conhecido como degenerescência acidental [112]. Comparando-se o sinal SERS em 1001 cm^{-1} para as amostras AgNPs(NaCl)/Agar/Al e AgNPs/Agar/Al, observa-se uma maior intensidade SERS para as amostras AgNPs/Agar/Al. Para concentrações menores que $1,0 \times 10^{-5}$, não é possível distinguir o sinal em 1001 cm^{-1} do ruído.

Wen e colaboradores, com a aplicação de sensores fluorescentes com alta sensibilidade e seletividade, chegaram a um LOD em ca. $1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$, próximo ao menor valor observado neste estudo, com a desvantagem de utilizarem uma técnica destrutiva [15]. Já Mabbott e colaboradores na detecção de mefedrona, utilizando o efeito SERS com AgNPs e um sistema Raman portátil, obtiveram um LOD de $9,06 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$, valor próximo ao menor valor verificado para a MA no presente trabalho [17].

4.4.3 Agar/Al

Na Figura 44 são representados os espectros Raman das médias das triplicatas (cada réplica contendo 100 (cem) medidas para cada área escolhida) da superfície da lâmina de alumínio recoberta com filme de gel de agarose sem AgNPs, sendo que (a) é a lâmina somente com o gel de agarose (b) lâmina com gel de agarose contendo MA em concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. (c) espectro SERS de uma amostra na mesma concentração depositada na lâmina de alumínio AgNPs/Agar, todos obtidos com objetiva de 50 \times .

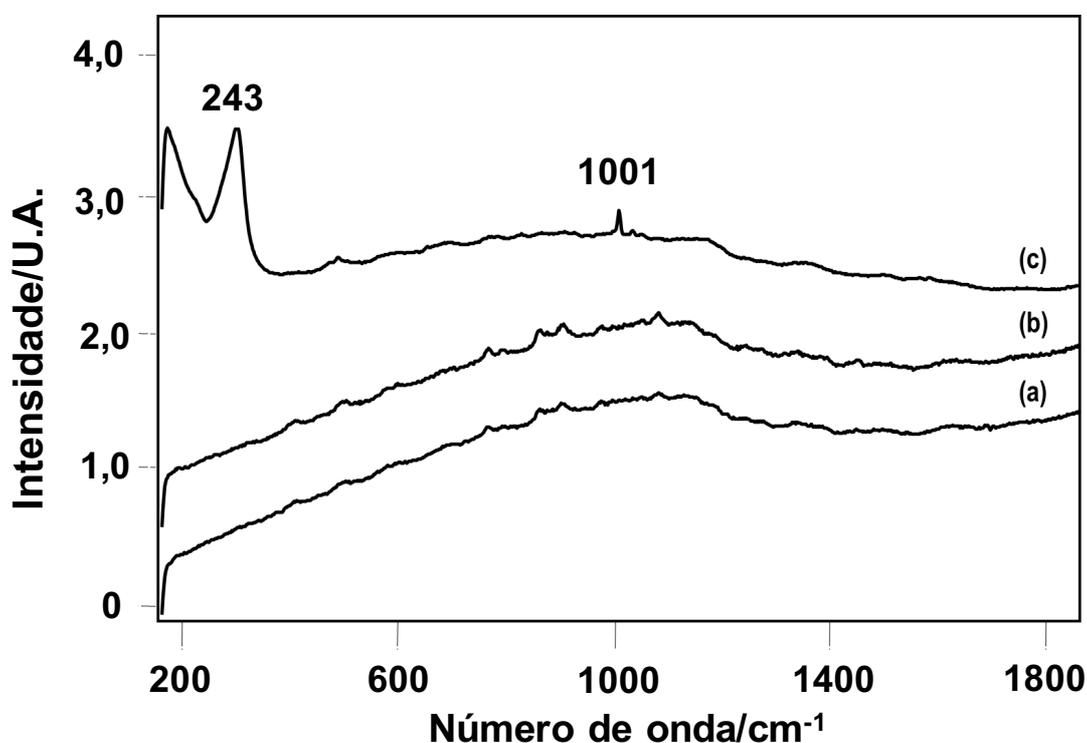


Figura 44. Espectros Raman da lâmina de alumínio recoberta com gel de agarose sem prata (a) sem MA; (b) gotejada com solução de cloridrato de MA $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L e (c) Espectro SERS da lâmina de AgNPs/Agar/Al com mesma solução para fins de comparação.

Na Figura 44, observa-se que para os testes em branco realizados com as lâminas de alumínio, não foram observadas diferenças significativas entre as lâminas sem MA (a) e com MA (b). Na mesma Figura, para fins de comparação,

verifica-se no espectro em (c), a intensificação do sinal obtido para uma amostra de mesma concentração de MA ($1,0 \times 10^{-3}$) com o uso da lâmina AgNPs/Agar/Al, atribuído ao efeito SERS [38]

4.5 Estudo da adsorção da MA nos substratos SERS ativo AgNPs(NaCl)/Agar/Al e AgNPs/Agar/Al

Para compreender melhor o sistema em estudo, ou seja, a interação entre a molécula de MA e o substrato SERS-ativo AgNPs/Agar, foram utilizadas as isotermas de Langmuir, Frumkin e Freundlich. As isotermas foram obtidas para as amostras depositadas sobre o filme de AgNPs/Agar nas lâminas de alumínio a partir dos espectros obtidos com a objetiva de 50 \times . Assim, foi investigada a variação da intensidade SERS da molécula de MA adsorvida em função de sua concentração, apresentada na Figura 45 (a) AgNPs(NaCl)/Agar/Al e (b) AgNPs/Agar/Al, onde é possível observar que a partir de uma determinada concentração (alta) a intensidade tende a não variar. Também foi possível comparar os resultados esperados com os dados obtidos. Para isso, as intensidades consideradas são resultantes dos valores médios das medidas em triplicatas, com cada réplica correspondendo a 100 espectros. Uma vez que não foi possível determinar a concentração de MA dentro da matriz de AgNPs/Agar, as isotermas de adsorção foram avaliadas utilizando as concentrações de MA em solução descritas na Tabela 8.

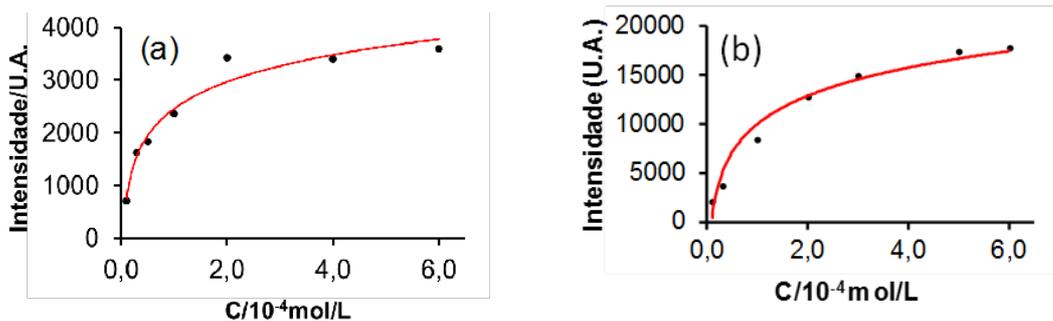


Figura 45. Variação da intensidade Raman pela concentração das amostras (a) AgNPs(NaCl)/Agar/Al e (b) AgNPs/Agar/Al.

4.5.1 Isotermas de Langmuir

As isotermas de Langmuir foram calculadas conforme a metodologia apresentada na seção 2.6.1 e os resultados são apresentados na Figura 46 demonstrando a variação do recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNP(NaCl)/Agar/Al, Fig.46(a) e a representação linear da isoterma de Langmuir para a MA adsorvida nesse filme, Fig.46(b). Na Figura 47 é apresentada a variação do recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNP/Agar/Al, Fig.47(b) e a forma linear da isoterma de Lagmir para esses sistemas, Fig.47(b).

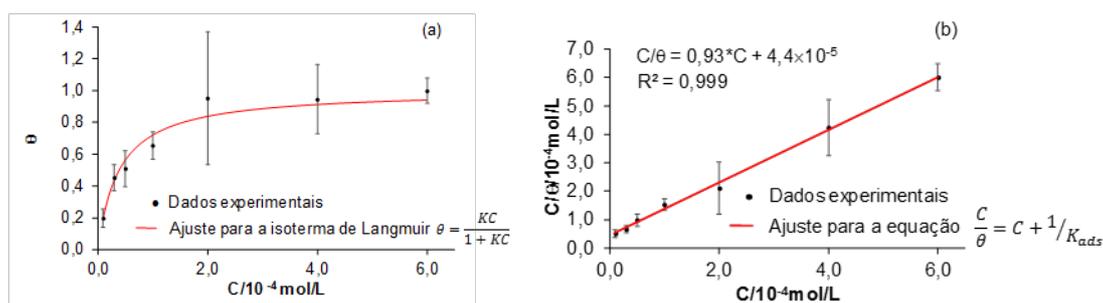


Figura 46. (a) Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNPs(NaCl)/Agar/Al e (b) Representação linear da isoterma de Langmuir para a MA adsorvida em AgNPs(NaCl)/Agar/Al.

O ajuste dos pontos experimentais para a equação da isoterma de Langmuir (forma não linear, Figura 46(a)) foi realizado considerando que o

coeficiente angular é unitário. Neste caso, o ajuste realizado leva a um valor de $K_{ads} = (2,6 \pm 0,4) \times 10^4$ mol/L. Para este valor de K_{ads} , obtém-se um valor de ΔG_{ads} de -20,1 kJ/mol ($\Delta G_{ads} = -RT \ln K_{ads}$). No entanto, o ajuste feito para a forma linear da isoterma de Langmuir (Figura 46(b)) o coeficiente angular obtido foi de 0,93, gerando uma $K_{ads} = (2,3 \pm 0,3) \times 10^4$ mol/L ($\Delta G_{ads} = -20,4$ kJ/mol). A pequena diferença entre os valores de K_{ads} obtidos pelos dois ajustes se deve ao fato do coeficiente linear obtido pela forma linear da equação ser diferente da unidade.

Os valores de ΔG_{ads} obtido indicam que a MA se adsorve sobre a superfície do filme à base do gel de AgNPs por meio de uma interação mais forte do que uma simples adsorção física. Uma vez que a MA em solução se encontra na forma catiônica, sua adsorção ocorre via formação de par iônico com o cloreto adsorvido.

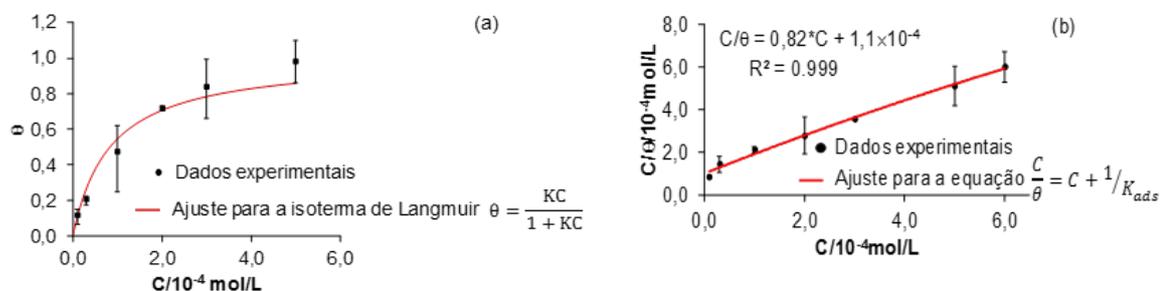


Figura 47. (a) Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNP/Agar/Al. e (b) Representação linear da isoterma de Langmuir para a MA adsorvida em AgNPs/Agar/Al.

Já no caso da superfície da lâmina de alumínio recoberta com o gel obtido na síntese sem NaCl, os ajustes realizados para a forma não linear (Figura 47(a)) e linear (Figura 47(b)) da isoterma de Langmuir levam a valores de K_{ads} de $(1,2 \pm 0,2) \times 10^4$ mol/L e $(9,2 \pm 0,8) \times 10^3$ mol/L, respectivamente. Neste caso observa-se uma diferença um pouco maior entre os dois valores de K_{ads} pois o coeficiente

angular obtido para a forma linear, 0,82, divergiu significativamente da unidade. Essa diferença sugere que o modelo de Langmuir para este caso não é o mais adequado. As Tabelas 11 e 12 apresentam os parâmetros obtidos para os dois casos analisados.

4.5.2 Isotermas de Frumkin

Para obter as isotermas de Frumkin, utilizou-se a metodologia apresentada em 2.6.2 e os resultados são apresentados na Figura 48, sendo os gráficos relativos ao recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNPs(NaCl)/Agar/Al, Fig.48(a) e AgNPs/Agar/Al, Fig.48(b).

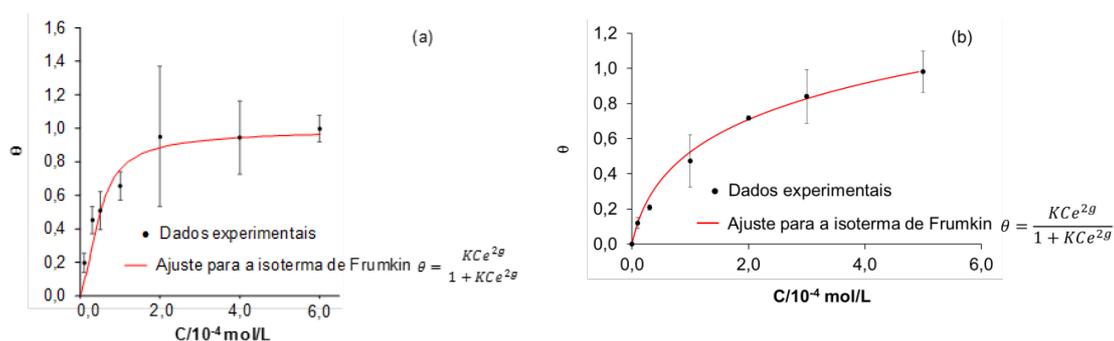


Figura 48. (a) Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNPs(NaCl)/Agar/Al. (b) Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de MA adsorvida em AgNP/Agar/Al.

Os ajustes pela isoterma de Frumkin para o gel sintetizado na presença e ausência de NaCl trouxeram valores de $g > 1$ (ver Tabelas 11 e 12), tornando possível concluir como atrativa o tipo de interação entre as moléculas de MA.

4.5.3 Isotermas de Freundlich

Por se basear em parâmetros empíricos, os valores de K obtidos para as isotermas de Freundlich não são relevantes para a discussão. Assim, para os

sistemas representados nas Figuras 49 e 50 serão considerados os valores de n como forma de avaliar o favorecimento ou não do processo de adsorção [84] [89].

Os ajustes realizados pela isoterma de Freundlich (Figura 49) para o sistema contendo o gel sintetizado na presença de NaCl demonstraram um valor de $n = 2,6$, permitindo concluir o favorecimento da adsorção da molécula de MA pelo sistema AgNPs(NaCl)/Agar/Al.

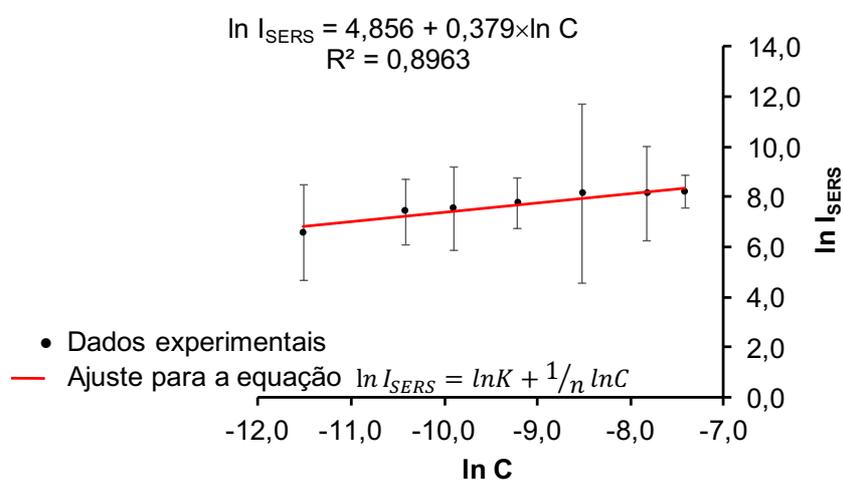


Figura 49. Representação linear da isoterma de Freundlich para a MA adsorvida em AgNPs(NaCl)/Agar/Al.

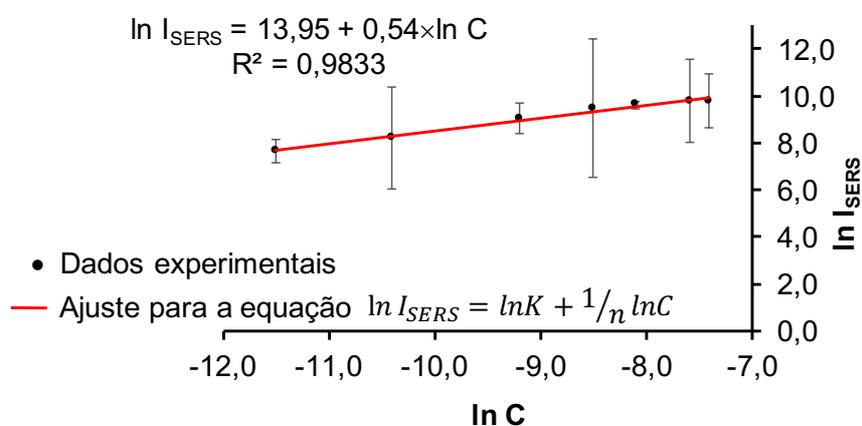


Figura 50. Representação linear da isoterma de Freundlich para a MA adsorvida em AgNPs/Agar/Al.

Já os ajustes realizados pela Isoterma de Freundlich para o sistema AgNPs/Agar/Al demonstraram um valor de $n = 1,8$ (Figura 50) que comprovou o favorecimento da adsorção da molécula de MA pelo sistema AgNPs/Agar/Al.

Para as Isotermas investigadas como ferramentas representativas do sistema de adsorção investigado, a que melhor se ajustou, de forma a apresentar os melhores parâmetros para os dois sistemas (gel sintetizado na presença e na ausência de NaCl) foi a Isoterma de Frumkin, conforme pode ser observado nos sumários apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Constantes de adsorção e demais parâmetros das isotermas para o sistema AgNPs(NaCl)/Agar/Al

Isoterma	Equação	$K_{ads}/mol^{-1}\cdot L$	Outros parâmetros	R^2	Chi^2	$\Delta G_{ads}/kJ\cdot mol^{-1}$
Langmuir(1)	$\theta = \frac{K_{ads}}{1 + K_{ads}}$	$(2,6 \pm 0,4) \times 10^4$		0,955	0,004	-20,1
Langmuir (2)	$\frac{C}{\theta} = 0,93C + \frac{1}{K_{ads}}$	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^4$		0,999		-20,4
Frumkin	$\theta = \frac{K_{ads} \exp(2g\theta)}{1 + K_{ads} \exp(2g\theta)}$	$(8,3 \pm 0,3) \times 10^3$	$g = 0,9 \pm 0,2$	0,991	$2,6 \times 10^{-10}$	-22,4
Freundlich	$\ln I_{SERS} = \ln K + \frac{1}{n} \log C$	$(7,2 \pm 0,3) \times 10^4$	$n = 2,6$	0,896		

* O valor de K na equação de Freundlich não guarda relação com a constante de adsorção.

Tabela 12. Constantes de adsorção e demais parâmetros das isotermas para o sistema AgNPs/Agar/Al

Isoterma	Equação	$K_{ads}/mol^{-1}\cdot L$	Outros parâmetros	R^2	Chi^2	$\Delta G_{ads}/kJ\cdot mol^{-1}$
Langmuir(1)	$\theta = \frac{K_{ads}}{1 + K_{ads}}$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^4$		0,969	0,005	-22,0
Langmuir (2)	$\frac{C}{\theta} = 0,82C + \frac{1}{K_{ads}}$	$(9,2 \pm 0,8) \times 10^3$		0,999		-22,2
Frumkin	$\theta = \frac{K_{ads} \exp(2g\theta)}{1 + K_{ads} \exp(2g\theta)}$	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^4$	$g = 1,1 \pm 0,1$	0,996	$1,5 \times 10^{-10}$	-24,1
Freundlich	$\ln I_{SERS} = \ln K + \frac{1}{n} \ln C$	$(14,4 \pm 0,3) \times 10^5$	$n = 1,8$	0,989		

* O valor de K na equação de Freundlich não guarda relação com a constante de adsorção.

Apesar das diferenças encontradas entre os valores de ΔG_{ads} para as isotermas de Langmuir e sua forma linear e também para a isoterma de Frumkin, estes são muito semelhantes e não há como afirmar, ao analisar somente as energias de adsorção, qual dos substratos promoverá a melhor interação com o adsorbato.

Considerando os valores de K_{ads} encontrados, observa-se que a interação entre a MA e as AgNPs não é tão forte, quando comparada com a adsorção de

R6G sobre AgNPs, onde se observou um valor de K_{ads} da ordem de 10^6 , para um sistema que seguiu um modelo de adsorção de Langmuir [68].

A seguir são apresentadas imagens Raman dos sistemas investigados, que evidenciam a correlação entre a intensidade SERS e o grau de recobrimento superficial da MA nos substratos investigados. As Figuras 51 e 52 representam a distribuição da cobertura dos sítios SERS ativos do substrato pela MA em concentrações de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L (síntese de AgNPs(NaCl)/Agar/Al) e $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L (síntese de AgNPs/Agar/Al), respectivamente. Observa-se nas Figuras 51 e 52 (a) a distribuição superficial da intensidade do sinal SERS em aproximadamente 1001 cm^{-1} e em (b) a distribuição superficial da intensidade do sinal em aproximadamente 243 cm^{-1} .

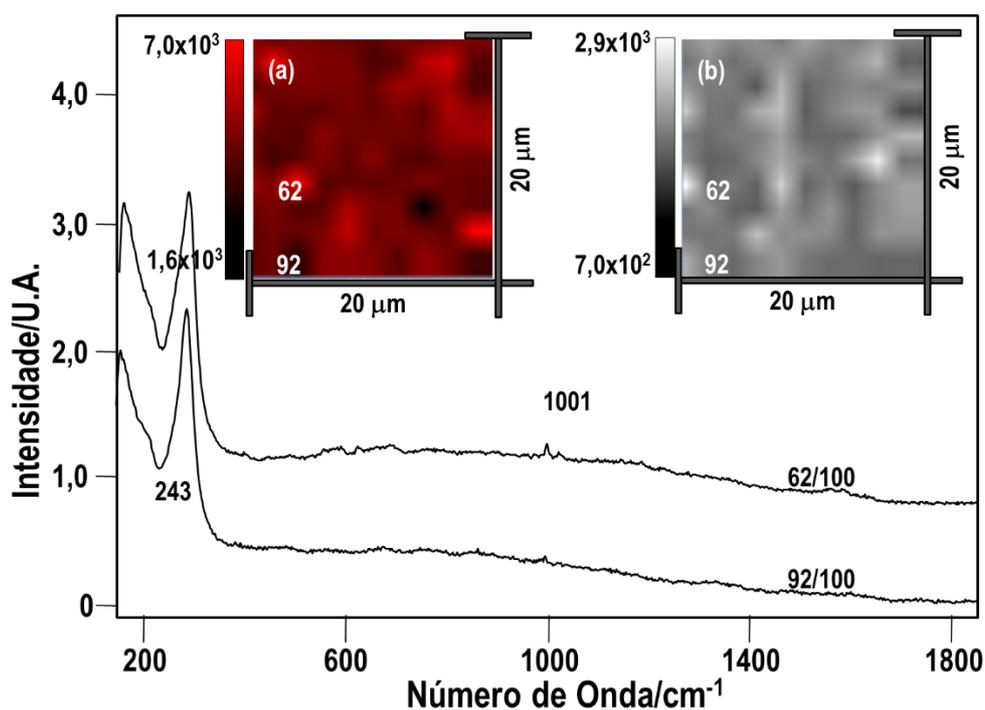


Figura 51. Imagens SERS da amostra AgNPs(NaCl)/Agar/Al contendo MA em concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L: (a) para o sinal SERS em 1001 cm^{-1} e (b) para o sinal SERS em 243 cm^{-1} . 62/100 e 92/100 são espectros individuais nos sítios indicados. Objetiva de $50\times$.

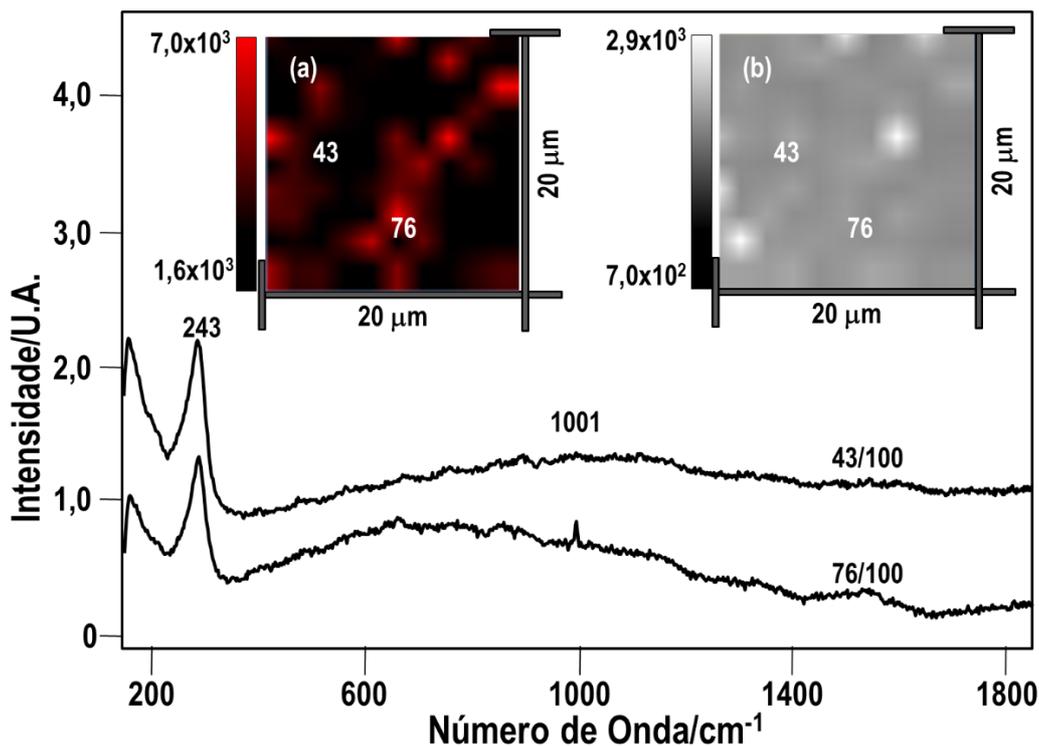


Figura 52. Imagens SERS da amostra AgNPs(NaCl)/Agar/Al contendo MA em concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L: (a) para o sinal SERS em 1001 cm^{-1} e (b) para o sinal SERS em 243 cm^{-1} . 43/100 e 76/100 são espectros individuais nos sítios indicados. Objetiva de $50\times$.

As diferenças nas intensidades do sinal SERS obtidas nas Figuras 51 e 52 se devem às diferentes concentrações das matrizes aquosas e consequente ocupação dos sítios SERS ativos pelas moléculas de MA. Assim, quanto maior a ocupação dos sítios SERS pela MA, observa-se um maior preenchimento da área medida na cor vermelha (Figuras 51 e 52 (a)) e quanto mais intensa a cor, maior será a intensidade do sinal encontrado. As Figuras 51 e 52 (b) indicam com a cor cinza a distribuição das AgNPs na superfície medida, caracterizada pela intensidade do sinal SERS em 243 cm^{-1} .

4.6 Impressão digital

Para a realização dos testes em impressões digitais, optou-se por utilizar lâminas de alumínio recobertas com filme AgNPs/Agar/Al, pois este sistema apresentou melhor relação sinal/ruído dentre os testes realizados com as

soluções de cloridrato de MA. A Figura 53 apresenta uma imagem de impressão digital dopada com solução de MA depositada sobre um substrato AgNPs/Agar/Al.



Figura 53. Imagem de impressão digital dopada com solução de MA $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L depositada sobre AgNPs/Agar/Al.

4.6.1 Mapeamento (*Mapping*)

Para melhor compreensão dos resultados obtidos nas áreas das lâminas contendo a impressão digital dopada com MA, percorrida pela fonte excitante, utilizou-se a função de aquisição *mapping* do software Wire 3.3 da Renishaw As imagens Raman obtidas por meio do mapeamento são apresentadas na Figura 54. Assim, foi possível demonstrar a distribuição de sítios SERS ativos ao longo da região da superfície percorrida pelo laser. Em particular na Figura 54 destacam dois sítios na superfície, 66/100 e 95/100, cujos espectros são apresentados logo abaixo das imagens Raman. Destaca-se o espectro de número 66/110, que representa uma das poucas regiões de “hot spot” formada ao longo da superfície do substrato. Adicionalmente, alguns pontos percorridos pelo laser apresentam somente o sinal em 240 cm^{-1} sugerindo que existem sítios SERS-ativos não ocupados por moléculas de MA. Isso pode ser constatado pelo espectro 20/100 cujo sítio está assinalado.

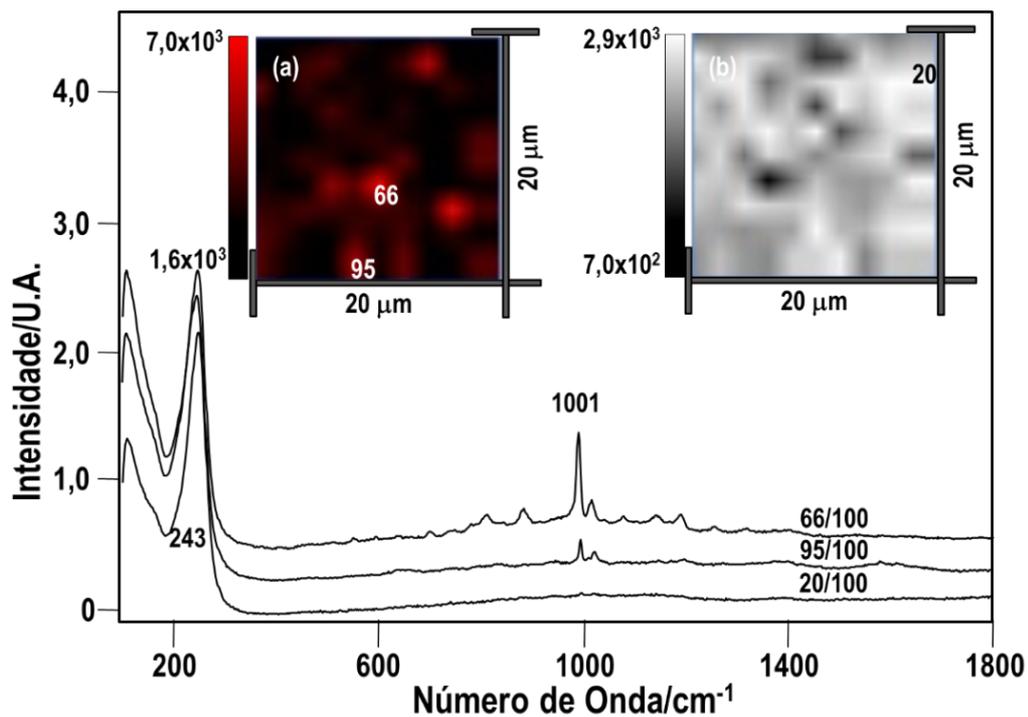


Figura 54. Imagens Raman da amostra de MA obtida de impressão digital depositada sobre a lâmina AgNPs/Agar/Al. (a) para o sinal SERS em 1001 cm⁻¹ e (b) para o sinal SERS em 243 cm⁻¹. 66/100, 95/100 e 20/100 são espectros individuais nos sítios indicados. Objetiva de 50×.

A impressão digital foi submetida ao processo de revelação, com o objetivo de validá-la numa possível identificação em algum estudo de caso. Após a revelação, a amostra foi novamente avaliada por espectroscopia Raman e uma atenuação do sinal da MA foi observado (Figura 55).

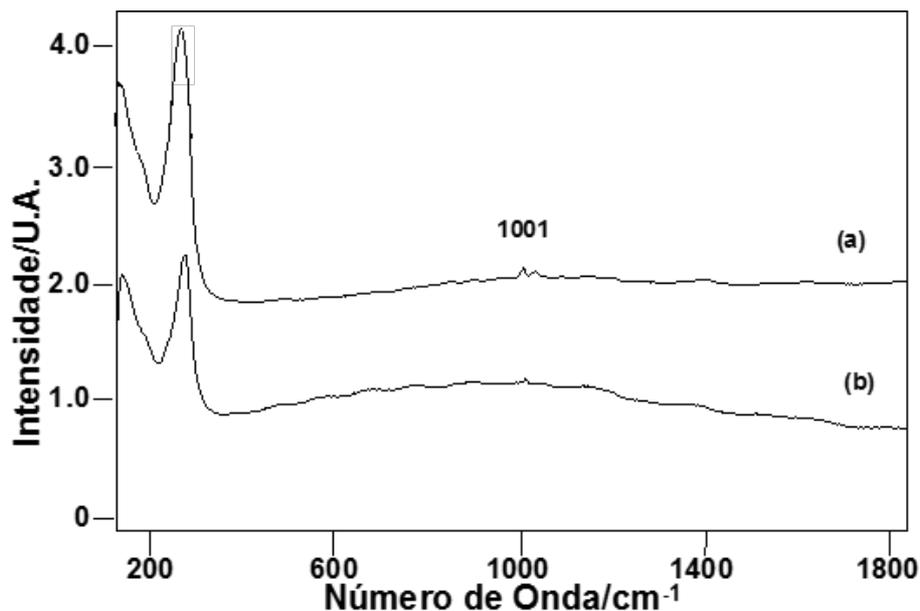


Figura 55. Espectros SERS de MA obtida de impressão digital depositada sobre a lâmina AgNPs/Agar/Al. (a) antes da revelação com pó revelador e (b) após a revelação com pó revelador. Cada espectro corresponde a média de 100 espectros individuais. Objetiva de 50×

West e colaboradores, em seu trabalho, utilizaram como agente revelador da impressão digital pó revelador, à base de alumínio, com o qual foi possível observar um bom sinal da anfetamina, droga utilizada naquele estudo. Sua molécula é bastante similar à da MA [25]. Assim, ainda que os resultados obtidos no presente trabalho não tenham sido satisfatórios para as medidas SERS realizadas após a revelação da impressão digital, nada impede que a análise SERS da digital possa ser realizada antes de sua revelação.

Dentre as metodologias estudadas para fins comparativos, essa foi a que mais se aproximou dos ideais inspiradores para a realização do presente trabalho, uma vez que, por um método simples, direto e, de acordo com os dados apresentados, se obteve êxito na obtenção de resultados e proporcionando soluções para um problema real enfrentado pela polícia nas regiões de fronteira e imigração; onde viajantes nacionais e internacionais tentam atravessar fronteiras com drogas ocultadas em bagagens constituídas, em sua grande

maioria, de material de polietileno. Muitas vezes também, é possível coletar impressões digitais e material entorpecente para análise por meio de fitas adesivas.

5. Conclusão

A síntese utilizada no presente trabalho para a produção de AgNPs dispersas em gel de agarose (AgNPs/Agar) cumpriu o papel esperado para o desenvolvimento deste projeto, com algumas limitações já observadas e que merecem mais discussão, senão vejamos: foi confirmada, conforme descrito no trabalho realizado por Oliveira e Rubim, a facilidade de manipulação do processo, a relativa rapidez da síntese das AgNPs, sua reprodutibilidade e também sua longa durabilidade e boa estabilidade. Os testes de atividade SERS das AgNPs ao longo do tempo mostram que se mantêm aproximadamente constante por pelo menos 6 meses.

A caracterização das AgNPs por MET mostrou que as AgNPs(NaCl)/Agar e AgNPs/Agar apresentaram morfologia esférica e diâmetros médios de $13,8 \pm 6,9$ nm e $13,5 \pm 3,6$ nm, respectivamente. Os resultados de MET também mostram, para ambos os substratos, a existência de agregados de AgNPs, os quais são importantes para investigações SERS, pois os maiores fatores de intensificação Raman são observados para moléculas adsorvidas nas regiões de fronteira entre nanopartículas agregadas, chamados “hot spots”.

O efeito da adição de cloreto na síntese das AgNPs se revela, tanto na diferença de tamanho das AgNPs, como nos espectros de absorção no UV-Vis, com o máximo de absorção das LSPR deslocadas para maior comprimento de onda quando a síntese é realizada na presença de cloreto.

Os resultados obtidos por meio do efeito SERS, utilizando lâminas de vidro e de Al como suporte para o depósito das AgNPs, mostram que os espectros SERS com o substrato AgNPs/Agar/Al apresentam melhor relação sinal/ruído, tanto para as AgNPs obtidas na presença, como na ausência de cloreto.

Com os substratos AgNPs/Agar/Al foi possível obter sinal SERS da MA adsorvida até uma concentração de 1×10^{-5} mol/L, em ambos os casos (síntese com ou sem cloreto de sódio). No entanto, a melhor relação sinal/ruído foi obtida para os espectros SERS das amostras preparadas na ausência de NaCl.

Os resultados obtidos mostram também que a intensidade SERS da MA não segue uma dependência linear com a concentração, mas apresentam uma tendência de atingir um valor constante para concentrações de cloridrato de MA maiores que 2×10^{-4} mol/L. Neste sentido, utilizando-se a intensidade SERS das soluções de cloridrato de MA em diferentes concentrações (I) e a intensidade SERS na condição de saturação da superfície (I_0) como referência, foi possível obter isotermas de adsorção empregando a expressão $\theta = I/I_0$ e ajustar os dados experimentais aos modelos de Langmuir, Frumkin e Freundlich. A análise dos resultados obtidos por meio das isotermas de adsorção sugerem que a MA adsorve sobre a superfície das AgNPs, via formação de para iônico, seguindo o modelo de Frumkin. Apesar das diferenças encontradas entre os valores de ΔG_{ads} , para as isotermas de Langmuir e sua forma linear e também para a isotermas de Frumkin, os valores são muito próximos e não há como afirmar, ao analisar somente as energias de adsorção, qual substrato (com ou sem NaCl) promoverá a melhor interação com o adsorbato em situações práticas.

A técnica também foi testada para detecção de MA em impressões digitais. Os resultados ainda que preliminares por se tratarem de testes em apenas um indivíduo foram satisfatórios para a concentração testada ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) da droga.

Por fim, os resultados obtidos indicam que a metodologia estudada é passível de aplicação, tanto para a determinação de MA em matrizes aquosas quanto para determinação de MA em impressões digitais, embora sejam necessárias mais investigações e validações acerca do método.

Perspectivas Futuras.

Conforme observado na literatura e nos experimentos realizados, a utilização do laser em 632,8 nm proporciona um alto sinal de fluorescência, o que pode dificultar a análise. Neste sentido, apesar do efeito desse tipo de interferência ter sido minimizado com a utilização das lâminas de alumínio, também devem ser consideradas as fontes de radiação disponíveis. Uma alternativa seria investigar a adsorção da molécula objeto deste trabalho utilizando AuNPs, uma vez que as AgNPs apresentam absorção na região de 400 – 500 nm. Sendo assim, para maiores comprimentos de onda do laser (785 ou 1064 nm), espera-se observar um menor efeito SERS. Ainda na literatura, é possível observar que a MA não possui forte afinidade com AgNPs, o que aumenta a necessidade de investigação de outras NPs. Complementarmente, investigar sistemas mais complexos, contendo por exemplo interferentes da droga que comumente são responsáveis por falsos positivos em testes preliminares, como por exemplo, a cafeína. Assim, buscar a utilização de

ferramentas estatísticas de análise multivariada (PLS- *Partial Least Square*), por exemplo, para quantificação das amostras, pode ser fundamental.

Além disso, como metas futuras de relevância na área, a realização de testes cegos, com amostras de drogas apreendidas as quais são manipuladas em laboratórios clandestinos permitirão cancelar a metodologia apresentada neste trabalho. Para caracterização complementar das amostras de teste cego pode ser utilizada cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS), conforme recomendação da UNODC. Ainda como testes complementares a este trabalho, pode-se realizar testes de espectroscopia de UV, para comparação de metodologias.

No que se refere à determinação de MA em impressões digitais, será necessário a realização de mais testes em trabalhos futuros no sentido de se determinar um LOD para a metodologia nessas situações; e também seguir o protocolo recomendado pela *International Fingerprint Research Group* (IFRG) [113], ligado à *International Association Identification*, para que o presente trabalho possa se tornar uma metodologia viável e aceitável no meio forense.

6. Bibliografia

- [1] UNODC, “World Drug Report 2016,” United Nations publication, Vienna, 2016.
- [2] UNODC, “United Nations Office on Drugs and Crime,” Acessado em dezembro de 2016. [Online]. Available: <http://www.unodc.org/lpo-brazil/pt/drogas/marco-legal.html>.
- [3] J. C. Maxwell e B. A. Rutkowski, “The prevalence of methamphetamine and amphetamine abuse in North America: a review of the indicators, 1992 – 2007,” *Drug Alcohol Rev*, p. 229-235, 2009.
- [4] A. A. Chasin e M. C. Salvadori, Estimulantes do sistema nervoso central. In Fundamentos de toxicologia, Atheneu, 1996.
- [5] M. Passagli, Toxicologia Forense: Teoria e Prática, Campinas: Millennium Editora, 2011.
- [6] A. Moffat, M. Osselton, B. Widdop e J. Watts, Clarke's analysis of drugs and poisons, London: Pharmaceutical Press, 2011.
- [7] SWGDRUG, “Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs,” [Online]. Available: <http://www.swgdrug.org/>. [Acesso em 15 12 2017].
- [8] A. T. Bruni, J. A. Velho e M. D. Oliveira, Fundamentos de Química Forense – Uma análise prática da química que soluciona crimes, Millennium Editora, 2012.
- [9] National Institute of Justice, “NIJ Standard–0604.01,” [Online]. Available: <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/183258.pdf>.
- [10] United Nations Office on Drugs and Crime, Recommended methods for the identification and analysis of amphetamine, methamphetamine and their ring-substituted analogues in seized materials, Viena: UNITED NATIONS , 2006.
- [11] M. Yonamine, *A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais.*, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2004.
- [12] “Uol Notícias,” Folha de São Paulo, [Online]. Available: <http://m.folha.uol.com.br/cotidiano/2011/07/951018-pf-apreende-187-mil-comprimidos-de-droga-sintetica-em-rr.shtml>. [Acesso em 10 2 2018].
- [13] “Metrópolis,” Estadão, [Online]. Available: <https://www.metropoles.com/brasil/policia-br/apreensao-de-metanfetamina-em-cumbica-cresceu-254-neste-semester>. [Acesso em 10 2 2018].
- [14] E. V. Benvenutti, Química Inorgânica – Átomos, Moléculas, Líquidos e Sólidos, Porto Alegre: UFRGS, 2003.
- [15] D. Wen, Y. Fua, L. Shia, C. Hea, L. Donga, D. Zhua, Q. Hea, H. Caoa e J. Chenga, “Fine structural tuning of fluorescent copolymer sensors for methamphetamine vapor detection,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 168, p. 283– 288, 2012.
- [16] C. Andreou, M. R. Hoonejani, M. R. Barmi, M. Moskovits e C. D. Meinhart, “Rapid detection of drugs of abuse in saliva using surface

- enhanced Raman spectroscopy and microfluidics,” *ACS Nano*, vol. 8, p. 7157-7164, 2013.
- [17] S. Mabbott, E. Correa, D. P. Cowcher, J. W. Allwood e R. Goodacre, “Optimization of parameters for the quantitative surface-enhanced raman scattering detection of mephedrone using a fractional factorial design and a portable Raman spectrometer,” *Analytical chemistry*, vol. 85, p. 923-931, 2012.
- [18] A. Choodum, K. Parabun, N. Klawach, N. N. Daeid, P. Kanatharana e W. Wongniramaikul, “Real time quantitative colourimetric test for methamphetamine detection using digital and mobile phone technology,” *Forensic Science International*, vol. 235, p. 8-13, 2014.
- [19] Z. Han, H. Liu, J. Meng, L. Yang, J. Liu e J. Liu, “Three-dimensional surface-enhanced Raman scattering hotspots in spherical colloidal superstructure for identification and detection of drugs in human urine,” *Analytical chemistry*, vol. 87, p. 9500-9506, 2015.
- [20] T. Irii, K. Maebashi, K. Fukui, R. Sohma, S. Matsumoto, S. Takasu e K. Iwadate, “Development of a dual test procedure for DNA typing and methamphetamine detection using a trace amount of stimulant-containing blood,” *Legal Medicine*, vol. 20, p. 53-60, 2016.
- [21] A. N. Lad, A. Pandya e Y. Agrawal, “Overview of nano-enabled screening of drug-facilitated crime: A promising tool in forensic investigation,” *Trends Anal Chem*, vol. 80, p. 458-470, 80 2016.
- [22] M. J. Choi, A. M. McDonagh, P. Maynard e C. Roux, “Metal-containing nanoparticles and nano-structured particles in fingerprint detection,” *Forensic Science International*, vol. 179, p. 87-97, 2008.
- [23] E. Leggett, E. Lee-Smith, S. Jickells e A. Russell, ““Intelligent” fingerprinting: simultaneous identification of drug metabolites and individuals by using antibody-functionalized nanoparticles,” *Angewandte Chemie*, vol. 119, p. 4178-418, 2007.
- [24] T. Zhang, C. Xueguo, R. Yang e Y. Xu, “Detection of methamphetamine and its main metabolite in fingerprints by liquid chromatography–mass spectrometry,” *Forensic Science International*, vol. 248, p. 10-14, 2015.
- [25] M. J. West e M. J. Went, “The spectroscopic detection of drugs of abuse in fingerprints after development with powders and recovery with adhesive lifters,” *Spectrochimica Acta Part A 71*, vol. 71, p.1984-1988 2008.
- [26] H. Tsuchihashi, M. katagi, M. Nishikawa, M. Tatsuno, H. Nishioka, A. Nara, E. Nishio e C. Petty, “Determination of Methamphetamine and Its Related Compounds Using Fourier Transform Raman Spectroscopy,” *Applied Spectroscopy*, vol. 51, p. 1796-1799, 1997.
- [27] T. Yang, X. Guo, H. Wang, S. Fu e H. Yang, “Magnetically optimized SERS assay for rapid detection of trace drug-related biomarkers in saliva and fingerprints,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 68, p. 350-357, 2015.
- [28] G. Ferreira, *Comportamento de partição da cocaína e seus adulterantes em SABs*, Viçosa: Dissertação de Mestrado UFV, 2012.

- [29] M. E. C. Vinadé, Métodos espectroscópicos de análise quantitativa, Santa Maria: Editora UFSM, 2005.
- [30] “European Union. Memo/11/704 18/10/2011: questions and answers on the Commission Recommendation on the definition of nanomaterial.” [Online]. Available: http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-11-704_en.htm. [Acesso em 2016 12 5].
- [31] D. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman e A. Timothy, Principios de Análise Instrumental, São Paulo: Bookman, 2009.
- [32] T. Juffmann, A. Milic, M. Muellneritsch, P. Asenbaum, A. Tsukernik, J. Tuexen, M. Mayor, O. Cheshnovsky e M. Arndt, *Nature Nanotechnology*, vol. 7, p. 296-299, 2012.
- [33] S. Groeblacher, K. Hammerer, M. R. Vanner e M. Aspelmeyer, “Observation of strong coupling between a micromechanical resonator and an optical cavity field,” *Nature*, vol. 460, p. 724-727, 2009.
- [34] Z. Han, H. Liu, B. Wang, S. Weng, L. Yang e J. Liu, “Three-dimensional surface-enhanced Raman scattering hotspots in spherical colloidal superstructure for identification and detection of drugs in human urine,” *Analytical chemistry*, vol. 87, p. 4821-4828, 2015.
- [35] R. Dong, S. Weng, L. Yang e J. Liu, “Detection and direct readout of drugs in human urine using dynamic surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machines,” *Analytical chemistry*, vol. 87, p. 2937-2944, 2015.
- [36] R. Elghanian., J. Storhoff., R. Mucic., R. Letsinger e C. Mirkin, “Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles,” *Science*, vol. 277, p. 1078-1081, 1997.
- [37] Q. Shi, Y. Shi, Y. Pan, Z. Yue, H. Zhang e C. Yi, “Colorimetric and bare eye determination of urinary methylamphetamine based on the use of aptamers and the salt-induced aggregation of unmodified gold nanoparticles,” *Microchimica Acta*, vol. 182, p. 505-511, 2015.
- [38] D. D. Faria, M. L. Temperini e O. Sala, “Vinte anos de efeito SERS,” *Química Nova*, vol. 22, p. 541-552, 1999.
- [39] O. Sala, Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho, São Paulo: Unesp, 1996.
- [40] P. W. Atkins, Físico-Química, Rio de Janeiro: LTC, 1999.
- [41] R. Lobinski e Z. Marczenko, “Recent advances in ultraviolet-visible spectrophotometry” Critical Reviews in Analytical Chemistry,” *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 23, p. 55-111, 1992.
- [42] W. Callister e D. Rethwisch, Materials Science and Engineering, An Introduction, Utah: Jogn Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [43] W. F. Smith e J. Hashemi, Fundamentos de engenharia e ciência dos materiais., AMGH Editora., 2013.
- [44] R. M. Silverstein, F. X. Webster e D. J. Kiemle, *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, Rio de Janeiro: LTC, 2000.
- [45] M. S. University, “Departament of Chemistry,” [Online]. Available: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/nmr/nmr1.htm>. [Acesso em 28 12 2017].

- [46] P. Corio, *A Contribuição do Mecanismo de Transferência de Carga para o Efeito SERS em Interfaces Eletroquímicas*, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998.
- [47] C. G. Turrell G., *The raman effect. Raman Microscopy. Developments and Applications*, Cambridge: Academic Press, 1996.
- [48] UNIPAMPA, "UNIPAMPA," [Online]. Available: <http://porteiros.s.unipampa.edu.br/espectroscopia/espectroscopia-e-simulacao/>. [Acesso em 15 12 2017].
- [49] L. Jensen e G. C. Schatz, "Resonance Raman scattering of rhodamine 6G as calculated using time-dependent density functional theory," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 110, p. 5973-5977, 2006.
- [50] L. F. de Oliveira, S. O. Dantas, E. S. Velozo, P. S. Santos e M. C. Ribeiro, "Resonance Raman investigation and semi-empirical calculation of the natural carotenoid bixin," *Journal of molecular structure*, vol. 435, p. 101-107, 1997.
- [51] M. Fleischmann, P. J. Hendra e A. J. McQuillan, "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode," *Chemical Physics Letters*, vol. 26, p. 163-166, 1974.
- [52] D. L. Jeanmaire e R. P. Van Duyne, "Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode," *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 84, p. 1-20, 1977.
- [53] R. M. Connatser, S. M. Prokes, O. J. Glembocki, R. L. Schuler, C. W. Gardner, S. A. Lewis e L. L. A., "Toward Surface-Enhanced Raman Imaging of Latent Fingerprints," *Journal of forensic sciences*, p. 1462-1470, 2010.
- [54] A. R. Johnson E., "Surface-enhanced infrared spectroscopy of monolayers," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 99, p. 9325-9330, 1995.
- [55] P. Leyton, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette e J. V. Garcia-Ramos, "Surface enhanced vibrational (IR and Raman) spectroscopy in the design of chemosensors based on ester functionalized p-tert-butylcalix [4] arene hosts.," *Langmuir*, vol. 21, p. 11814-11820, 2005.
- [56] F. A. Carrasco, M. Campos-Vallette, P. Leyton, F. Diaz, R. Clavijo, E. V. García-Ramos, N. Inostroza, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes e R. Koch, "Study of the interaction of pollutant nitro polycyclic aromatic hydrocarbons with different metallic surfaces by surface-enhanced vibrational spectroscopy (SERS and SEIR).," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 107, p. 9611-9619, 2003.
- [57] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn e W. Akemann, "Surface-enhanced Raman scattering," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 4, p. 1143, 1992.
- [58] J. Rubim, "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) on silver electrodes as a technical tool in the study of the electrochemical reduction of cyanopyridines and in quantitative analysis," *Journal of*

- electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, vol. 220, p. 339-350, 1987.
- [59] H. Ueba, "Role of defect induced charge transfer excitation in SERS," *Surface Science Letters*, vol. 129, p. 267-270, 1983.
- [60] J. C. Rubim, P. Corio, M. C. Ribeiro e M. Matz, "Contribution of Resonance Raman Scattering to the Surface-Enhanced Raman Effect on Electrode Surfaces. A Description Using the Time Dependent Formalism," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 99, p. 15765-15774, 1995.
- [61] J. Olson, S. Dominguez-Medina, A. Hoggard, L. Y. Wang, W. S. Chang e L. S., "Optical characterization of single plasmonic nanoparticles," *Chemical Society Reviews*, vol. 44, p. 40-57, 2015.
- [62] M. A. Martins e T. Trindade, "Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico," *Química Nova*, vol. 35, p. 1434-1446, 2012.
- [63] G. C. Schantz e R. P. Van Duine, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Chichester: Eds. Chalmers, J. M.; Griffiths, P. R John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- [64] C. L. Hayner, A. D. McFarland e R. P. Van Duyne, "Surface-enhanced Raman spectroscopy," *Analytical Chemistry*, vol. 10, p. 338A-346A, 2005.
- [65] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari e M. S. Feld, "Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)," *Physical review letters*, vol. 78, p. 1667-1670, 1997.
- [66] P. Hildebrandt e M. Stockburge, "Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of Rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 88, p. 5935-5944, 1984.
- [67] E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer e P. G. Etchegoin, "Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 111, p. 13794-13803, 2007.
- [68] K. de Oliveira e J. Rubim, "Surface-enhanced Raman spectroscopy of molecules adsorbed on silver nanoparticles dispersed an agarose gel and their adsorption isotherms," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 86, p. 290-301, 2016.
- [69] A. Campion e P. Kambhampati, "Surface-enhanced Raman scattering," *Chemical Society Reviews*, vol. 27, p. 241-250, 1998.
- [70] M. Cyrankiewicz, T. Wybranowski e S. Kruszewski, "Study of SERS efficiency of metallic colloidal system," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 79, p. 012013, 2007.
- [71] T. Vo-Dinh, "Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 17, p. 557-582, 1998.
- [72] D. P. dos Santos, M. L. Temperini e B. A. G., "Mapping the energy distribution of SERRS hot spots from Anti-Stokes to Stokes intensity ratios," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, p. 13492-13500, 2012.

- [73] S. Grésillon, L. Aigouy, A. C. Boccara, J. C. Rivoal, X. Quelin, C. Desmarest, P. Gadenne, V. A. Shubin, A. K. Sarychev e V. M. Shalaev, "Experimental observation of localized optical excitations in random metal-dielectric films," *Physical Review Letters*, vol. 82, p. 4520, 1999.
- [74] A. M. Michaels, J. Jiang e L. Brus, "Ag nanocrystal junctions as the site for surface-enhanced Raman scattering of single rhodamine 6G molecules," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, p. 11965-11971, 2000.
- [75] F. Svedberg, Z. Li, H. Xu e M. Käll, "Creating hot nanoparticle pairs for surface-enhanced Raman spectroscopy through optical manipulation," *Nano letters*, vol. 6, p. 2639-2641, 2006.
- [76] J. M. McLellan, A. Siekkinen, J. Chen e Y. Xia, "Comparison of the surface-enhanced Raman scattering on sharp and truncated silver nanocubes," *Chemical Physics Letters*, vol. 427, p. 122-126, 2006.
- [77] E. Insumos, "Editora Insumos," [Online]. Available: http://insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/87.pdf. [Acesso em 15 12 2017].
- [78] B. O. Okesola e D. K. Smith, "Applying low-molecular weight supramolecular gelators in an environmental setting—self-assembled gels as smart materials for pollutant removal," *Chemical Society Reviews*, vol. 45, p. 4226-4251, 2016.
- [79] C. Lofrumento, M. Ricci, E. Platania, M. Becucci e C. E., "SERS detection of red organic dyes in Ag-agar gel," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 44, p. 47-54, 2013.
- [80] M. Keating, Y. Chen, I. A. Larmour, K. Faulds e D. Graham, "Growth and surface-enhanced Raman scattering of Ag nanoparticle assembly in agarose gel," *Measurement Science and Technology*, vol. 23, p. 84006, 2012.
- [81] R. A. Alvarez-Puebla e L. M. Liz-Marzan, "Traps and cages for universal SERS detection," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, pp. 43-51, 2012.
- [82] A. Subaihi, H. Muhamadali, S. T. Mutter, E. Blanch, D. I. Ellis e R. Goodacre, "Quantitative detection of codeine in human plasma using surface-enhanced Raman scattering via adaptation of the isotopic labelling principle," *Analyst*, vol. 142, p. 1099-1105, 2017.
- [83] R. A. Sulk, R. C. Corcoran e K. T. Carron, "Surface-enhanced Raman scattering detection of amphetamine and methamphetamine by modification with 2-mercaptopyridine," *Applied spectroscopy*, vol. 53, p. 954-959, 1999.
- [84] J. S. Day, H. G. Edwards, S. A. Dobrowski e V. A. M., "The detection of drugs of abuse in fingerprints using Raman spectroscopy I: latent fingerprints," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 60, p. 563-568, 2004.
- [85] C. B. Vidal, A. C. A. D. Lima, R. F. D. Nascimento, G. S. C. Raulino e D. D. Q. Melo, *Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais*, Fortaleza: Imprensa Universitária UFC, 2014.

- [86] C. S. Fugivara, *Cinética de adsorção do n-propanol sobre eletrodo de platina platinizada em solução de ácido sulfúrico*, Tese de doutorado: Universidade de São Paulo, 1989.
- [87] B. Linhares, *Preparação de carvão ativado a partir de resíduos de erva-mate e seu uso como adsorvente na remoção de poluente orgânico em solução aquosa*, Dissertação de Mestrado: Universidade Federal de Santa Maria, 2013.
- [88] C. S. Fugivara, *Cinética de adsorção do n-propanol sobre eletrodo de platina platinizada em solução de ácido sulfúrico*, tese de Doutorado: Universidade de São Paulo, 2009.
- [89] F. H. M. F., "Über die adsorption in lasungen," *Physical Chemistry*, vol. 57A, p. 385–470, 1906.
- [90] B. Bowman, "Conversion of Freundlich adsorption K values to the mole fraction format and the use of SY values to express relative adsorption of pesticides," *Soil Science Society of America Journal*, vol. 46, p. 740-743, 1982.
- [91] P. T. Anastas e J. C. Warner, *Green chemistry: theory and practice*, Oxford : Oxford university press, 2000.
- [92] IUPAC, "International Union for Pure and Applied Chemistry," *Pure Appl. Chem*, p. 1207, 2000.
- [93] MMA, "Agenda 21," [Online]. Available: <http://www.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/agenda-21>. [Acesso em 15 12 2017].
- [94] EPA, "U.S. Environmental Protection Agency," [Online]. Available: <http://www.epa.gov/greenchemistry>. [Acesso em 15 12 2017].
- [95] M. Z. Kassae, A. Akhavan, N. Sheik e A. Sodagar, "Antibacterial effects of a new dental acrylic resin containing silver nanoparticles," *Journal of applied polymer science*, vol. 110, p. 1699-1703, 2008.
- [96] O. V. Salata, "Applications of nanoparticles in biology and medicine," *Journal of nanobiotechnology*, vol. 2, p. 3, 2004.
- [97] M. Ahamed, M. S. AlSalhi e M. K. J. Siddiqui, "Silver nanoparticle applications and human health," *Clinica chimica acta*, vol. 411, p. 1841-1848, 2010.
- [98] F. T. Mathias, R. M. Romano e R. M. A., "Avaliação dos efeitos toxicológicos e ambientais de nanopartículas de sais de prata," *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 35, p. 187-193, 2015.
- [99] F. Vanhaecke, "Nanoecotoxicology: Nanoparticle behaviour dissected," *Nature nanotechnology*, vol. 11, p. 656-657, 2016.
- [100] M. S. Matias, *Tratamento de nanopartículas de prata por eletrocoagulação.*, Trabalho de Conclusão de Curso: Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- [101] M. Y. A. Mollah, R. Schennach, J. R. Parga e C. D. L., "Electrocoagulation (EC)—science and applications," *Journal of hazardous materials*, vol. 84, p. 29-41, 2001.
- [102] Josélio Azevedo de Souza (Coordenador), *Papiloscopia Forense*, Brasília: Academia Nacional de Polícia, 2012, p. 321.

- [103] C. H. Bae, S. H. Nam e S. M. Park, "Formation of silver nanoparticles by laser ablation of a silver target in NaCl solution," *Applied Surface Science*, vol. 197, p. 628-634, 2002.
- [104] H. D. Santana, D. A. Zaia, P. Corio, F. El Haber e G. Louarn, "Preparation and characterization of SERS-active substrates: a study of the crystal violet adsorption on silver nanoparticles," *Química Nova*, vol. 29, p. 194-199, 2006.
- [105] G. A. Martinez-Castanon, N. Nino-Martinez, F. Martinez-Gutierrez, J. R. Martinez-Mendoza e F. Ruiz, "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 10, p. 1343-1348, 2008.
- [106] K. A. Willets e R. P. Van Duyne, "Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing," *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 58, p. 267-297, 2007.
- [107] F. T. Noggle, C. R. Clark, K. H. Bouhadir e J. DeRuiter, "Methods for the differentiation of methamphetamine from regioisomeric phenethylamines," *Journal of chromatographic science*, vol. 33, p. 31-36, 1991.
- [108] T. S. Cantrell, B. John, L. Johnson e A. C. Allen, "A study of impurities found in methamphetamine synthesized from ephedrine.," *Forensic Science International*, vol. 39, p. 39-53, 1988.
- [109] M. S. Santos e L. A. Colnago, "Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas," *Química Nova*, vol. 36, p. 324-330, 2013.
- [110] M. Alcolea Palafox, "Scaling factors for the prediction of vibrational spectra. I. Benzene molecule.," *International Journal of Quantum Chemistry*, vol. 77, p. 661-684, 2000.
- [111] J. S. Triplett, J. A. Hatfield, T. L. Kaeff, C. R. Ramsey, S. D. Robinson e A. F. Standifer, "Raman spectroscopy as a simple, rapid, nondestructive screening test for methamphetamine in clandestine laboratory liquid," *Journal of forensic sciences*, vol. 58, p. 1607-1614, 2013.
- [112] O. F. Nielsen, P. A. Lund e E. Praestgaard, "Hydrogen bonding in liquid formamide," *The Journal of Chemical Physics A low frequency Raman study*, vol. 77, p. 3878-3883, 1982.
- [113] International Fingerprint Research Group, "Guidelines for the assessment of fingerprint detection techniques," *J. Forensic Identif.*, vol. 64, p. 174-200, 2014.