

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**DOUTORADO EM QUÍMICA**

**Aline Luciano Filgueiras**

**Adsorção de antibióticos em superfícies de nanopartículas de ouro ou prata e  
suas interações *in vitro* com filmes biológicos**

**Juiz de Fora**  
**2017**

**Aline Luciano Filgueiras**

**Adsorção de antibióticos em superfícies de nanopartículas de ouro ou prata e suas interações *in vitro* com filmes biológicos**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana.

**Juiz de Fora**

**2017**

Dedico este trabalho ao meu orientador Antonio Carlos pela paciência e carinho nestes  
6 anos de convivência

Ao meu marido Artur, aos meus pais Sebastião e Ana e a minha irmã Márcia pelo amor  
incondicional e apoio nesses anos

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que é a base de toda essa conquista

Aos meus pais Ana e Sebastião pelos ensinamentos da vida, apoio e por me darem todas as condições possíveis para finalização dos meus estudos.

Ao meu marido Artur pelo incentivo, dedicação, paciência e ajuda nos momentos em que mais precisei.

A minha irmã Márcia pela amizade e por sempre ter me escutado nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Antonio Carlos Sant'Ana pelo ensinamento, pela amizade, pelo apoio e por sempre ter acreditado em nosso trabalho.

Ao Prof. Gustavo F.S. Andrade e a Profa. Celly M. S. Izumi pelos ensinamentos e pela colaboração com meu aprendizado.

Ao Prof. Hélio Ferreira dos Santos e ao Prof. Diego Paschoal pela realização dos cálculos teóricos dos antibióticos.

A Profa. Michele Munk e as alunas Leonara Fayer e Rafaella pela ajuda nos ensaios de citotoxicidade das nanopartículas de prata.

Ao Prof. Luiz Fernando Cappa de Oliveira que sempre ajudou nosso grupo nos momentos de dificuldade.

Aos pesquisadores do INMETRO, Dra. Lídia Sena, Dr. Bráulio Archanjo e Dr. Celso Sant'Anna pela realização das imagens de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Ao pesquisador Humberto Brandão e a pós doutoranda Camila Almeida pela realização das medidas de DLS e pela centrifugação do coloide de prata.

As minhas alunas de iniciação Francieli e Tailine que me ajudaram a realizar este trabalho.

Aos grandes amigos Dhieniffer, Douglas, Vanessa End e Nelson Luis que mesmo de longe sempre me auxiliaram em mensagens trocadas.

Aos amigos de laboratório Linus, Bruno, Flávia, Débora, Tatiana, Gabriela, Raíssa, Pedro, Marcelo, Hudson, Beatriz, Álvaro, Natália, Giovana, Hugo, Paulo, Erix Patrícia Lopes e Patrícia Santos pela amizade e pela ajuda nos momentos de necessidade.

Aos amigos dos outros laboratórios que também moram em meu coração  
Tamires, Rafaella, Leonã e Alessandro.

A todos que de certa forma contribuíram para a finalização deste trabalho.

“Aprendi através da experiência amarga a suprema lição: controlar minha ira e torná-la como o calor que é convertido em energia. Nossa ira controlada pode ser convertida numa força capaz de mover o mundo”.

Mahatma Gandhi

## RESUMO

Nesta tese investigou-se as interações químicas dos antimicrobianos tinidazol, metronidazol, aztreonam, rifampicina e tetraciclina (TC) adsorvidos sobre superfícies metálicas de nanopartículas de ouro (AuNP) ou prata (AgNP) através das técnicas espectroscópicas de espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS), de espalhamento Raman ressonante intensificado por superfície (SERRS) e de absorção no ultravioleta, visível e infravermelho próximo (UV-VIS-NIR). Também foram investigadas, a citotoxicidade das AgNP, quitosana (QUIT), TC e das combinações AgNP com quitosana (AgNP+QUIT), e AgNP com QUIT e TC (AgNP+QUIT+TC) frente a células de fibroblastos bovinos. Foram obtidas as imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das bactérias *K.pneumoniae* e *S. aureus* na ausência e presença das AgNP.

Diferentes rotas sintéticas de AuNP e AgNP foram propostas, com o objetivo de se aprimorar as possíveis aplicações dessas sínteses. As AgNP devem ser pequenas para aplicações em experimentos biológicos e devem estar em ressonância com as radiações excitantes de comprimento de onda em 532, 633 ou 1064 nm quando forem utilizadas nos experimentos SERS.

Os espectros SERS dos adsorbatos estudados foram obtidos na ausência e na presença dos modificadores de superfície 2-mercaptoetanol, polivinil álcool (PVA) ou íons cloreto. A presença destes modificadores superficiais permitiu monitorar os mecanismos de adsorção, que levaram a padrões espectrais SERS distintos. A análise dos espectros SERS da rifampicina foi baseada nas modificações observadas na estrutura eletrônica do grupo cromóforo, enquanto que para o tinidazol, metronidazol e aztreonam as diferenças nos padrões espectrais foram devidas a proximidade do sítio de adsorção do analito em relação à superfície metálica. A atribuição vibracional dos espectros Raman e SERS foi baseada em cálculos teóricos obtidos da teoria do funcional de densidade (DFT) das moléculas isoladas ou interagindo com átomos de metal. Este trabalho foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Diego Paschoal da Universidade Federal do Rio de Janeiro e com o Prof. Dr. Hélio Ferreira dos Santos da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As imagens TEM das bactérias *K. pneumoniae* e *S.aureus* obtidas na ausência e presença das AgNP+QUIT foram realizadas em colaboração com o Dr. Celso

Sant'Ana e o aluno Mateus Eugênio do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

Os ensaios de citotoxicidade das diferentes combinações de AgNP frente as células de fibroblastos bovinos foram realizados através do ensaio colorimétrico com brometo de 3, (-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Este trabalho foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Michele Munk da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Palavras-chave: Espectroscopia de Espalhamento Raman Intensificado por Superfície. Nanopartículas. Citotoxicidade. Fibroblasto Bovino.

## ABSTRACT

In this thesis were investigated the chemical interaction of the antimicrobians tinidazole, metronidazole, aztreonam, rifampicin and tetracycline adsorbed on metallic surfaces of gold (AuNP) or silver nanoparticles (AgNP) by using the spectroscopic techniques surface enhanced Raman scattering (SERS), surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS) and absorption in ultraviolet, visible and near infrared regions (UV-VIS-NIR). The cytotoxic effects of silver nanoparticles, chitosan (QUIT), tetracycline (TC) and its combinations AgNP with chitosan (AgNP+QUIT), and AgNP with QUIT and TC (AgNP+QUIT+TC) against bovine fibroblast cells were also investigated. The images using transmission electron microscopy (TEM) were obtained from the bacteria *K.pneumoniae* and *S. aureus* in the absence and presence of AgNP +QUIT.

Different AuNP and AgNP were synthesized, with the aim of improving the possible applications of these syntheses. These have to be small in the biological experiments and should be in resonance with laser lines at 532, 633 or 1064 nm when used in the SERS experiments.

The SERS spectra of the studied adsorbates were obtained in the absence and presence of the surfaces modifiers 2-mercaptoethanol, chloride ions or polyvinyl alcohol (PVA). The presence of these surfaces modifiers allowed monitoring adsorption mechanisms, which led to distinct SERS spectral patterns. The analyses of the SERS spectra of rifampicin were based on the observed changes in the electronic structure of the chromophore group, while for the tinidazole, metronidazole and aztreonam the differences in the spectral patterns were due to the proximity of anchor site of the analyte in relation to the metallic surface. The vibrational assignments of the Raman and SERS spectra were based on theoretical calculations obtained from density functional theory (DFT) of the isolated molecules or in interaction with metallic atoms. The DFT studies were made in collaboration with the Prof.Dr.Diego Paschoal from Universidade Federal do Rio de Janeiro and Prof.Dr H elio Ferreira dos Santos from Universidade Federal de Juiz de Fora.

The TEM images of *K. pneumoniae* and *S.aureus* bacteria obtained in the absence and in the presence of AgNP+QUIT were made in collaboration with the researcher Celso

Sant'Ana and its student Mateus Eugênio from Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

The cytotoxicity assays of the different combination of AgNP and chitosan and tetracycline against bovine fibroblast cells were made through colorimetric assay using MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. The biological assay were made in collaboration with the Prof.Dr. Michele Munk and its students Leonara Fayer and Rafaella Zanetti from Universidade Federal de Juiz de Fora.

Keywords: Surface Enhanced Raman Scattering. Nanoparticles. Cytotoxicity. Bovine Fibroblasts.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismo de ação de diversas classes de antibióticos na célula bacteriana.	24
Figura 2: Evolução dos níveis de energia eletrônicos em materiais metálicos.	32
Figura 3: Fator de qualidade de diferentes metais	35
Figura 4: Diagrama de energia ilustrando a banda de energia de nanoestruturas metálicas e os orbitais HOMO e LUMO da molécula adsorvida	37
Figura 5: Estrutura molecular do TI	42
Figura 6: Estrutura molecular do MT	44
Figura 7: Estrutura molecular do AZ	45
Figura 8: Estrutura molecular da RP	46
Figura 9: Estrutura molecular da TC	47
Figura 10: Espectros UV-VIS das sínteses A1.1 e A1.2 preparadas com micropipeta; A1.3 e A1.4 preparadas com bomba de seringa e taxa de injeção 3,0 mL/min; A1.5 preparada com bomba de seringa e taxa de injeção 0,5 mL/min.	57
Figura 11: Imagem SEM do coloide A1.2	58
Figura 12: Distribuição de tamanhos do coloide A1.1	59
Figura 13: Espectros UV-VIS das sínteses A2.1 “seed”; A2.2 preparado com 1 mL de A2.1; A2.3 preparado com 2,68 mL de A2.2.	61
Figura 14: Imagem SEM do coloide A2.3	62
Figura 15: Distribuição de tamanhos do coloide A2.3	62
Figura 16: Espectros UV-VIS das AgNP preparadas de acordo com o método B.	64
Figura 17: Imagens SEM do coloide B1	64
Figura 18: Espectro UV-VIS das AuNP obtidas de acordo com o método C.	65
Figura 19: Espectro SERS do branco do coloide A1	67
Figura 20: Espectros UV-VIS das AgNP na presença e ausência do ME. Caminho ótico: 1mm.	68
Figura 21: Espectros Raman e SERS do ME em diferentes concentrações	69
Figura 22: Espectro SERS do branco do coloide A2.3	70
Figura 23: Análise da adsorção do TI em AgNP por espectroscopia UV-VIS	71
Figura 24: Análise da adsorção do TI em AgNP modificadas ou não por 2-mercaptoetanol por espectroscopia UV-VIS	72

Figura 25: Agregação das AgNP na presença do TI imediatamente preparadas e após 3 h de adsorção .....	73
Figura 26: Geometria otimizada do TI junto com os átomos rotulados .....	74
Figura 27: Espectros Raman do TI experimental e teórico .....	75
Figura 28: Geometria otimizada do TI interagindo com 2 átomos de prata.....	77
Figura 29: Espectros SERS do TI na ausência e presença dos modificadores de superfície ME e HCl junto com o espectro Raman calculado para o modelo do complexo de superfície.....	78
Figura 30: Efeito da potência do laser nos espectros SERS do TI adsorvido sobre AgNP modificadas quimicamente com 2-mercaptoetanol .....	81
Figura 31: Estudo da reprodutibilidade dos espectros SERS do TI. ....	83
Figura 32: Análise da adsorção do MT em AgNP por espectroscopia UV-VIS .....	84
Figura 33: Análise da adsorção do MT em AgNP modificadas ou não por 2-mercaptoetanol por espectroscopia UV-VIS .....	85
Figura 34: Agregação das AgNP na presença do MT imediatamente preparadas e após 3 h de adsorção .....	86
Figura 35: Geometria otimizada do MT .....	87
Figura 36: Espectros Raman experimental e teórico do MT .....	88
Figura 37: Geometria otimizada do MT interagindo com 2 átomos de prata.....	90
Figura 38: Espectros SERS do MT na ausência e presença dos modificadores de superfície ME e PVA junto com o espectro Raman calculado para o modelo do complexo de superfície.....	91
Figura 39: Espectros SERS do PVA 1%, do MT adsorvido sobre AgNP modificadas com PVA e subtração dos espectros.....	94
Figura 40: Espectros SERS do MT adsorvido em AgNP modificadas quimicamente com PVA e ME na faixa de 100-2000 $\text{cm}^{-1}$ .....	95
Figura 41: Estudo da reprodutibilidade dos espectros SERS do MT. ....	96
Figura 42: Análise da adsorção do AZ em AgNP por espectroscopia UV-VIS.....	97
Figura 43: Análise da adsorção do AZ em AgNP modificadas ou não por 2-mercaptoetanol por espectroscopia UV-VIS .....	98
Figura 44: Agregação das AgNP na presença do AZ imediatamente preparadas e após 3 h de adsorção .....	99
Figura 45: Geometria otimizada do AZ.....	100
Figura 46: Espectros Raman experimental e teórico do AZ.....	101

Figura 47: Geometria otimizada do $AZ^{2-}$ interagindo com 2 átomos de prata.....	103
Figura 48: Espectros SERS do $AZ^{2-}$ na ausência e presença do modificador de superfície ME junto com o espectro Raman calculado para o modelo do complexo de superfície .....	104
Figura 49: Estudo da reprodutibilidade dos espectros SERS do AZ.....	107
Figura 50: Análise da adsorção da RP em AgNP por espectroscopia UV-VIS .....	109
Figura 51: Análise da adsorção da RP em AgNP modificadas por 2-mercaptoetanol por espectroscopia UV-VIS .....	110
Figura 52: Análise da adsorção da RP em AuNP por espectroscopia UV-VIS .....	111
Figura 53: Geometria otimizada da RP, e fórmula estrutural com os rótulos dos átomos .....	112
Figura 54: Espectros Raman ressonante e SERRS da RP adsorvida em AgNP na ausência e presença do ME $\lambda_0=532$ nm .....	113
Figura 55: Espectro Raman pré ressonante e SERS da RP adsorvida em AgNP ou AuNP modificadas ou não por ME e HCl. $\lambda_0= 633$ nm .....	116
Figura 56: Espectros Raman e SERS da RP adsorvida em AuNP na ausência e presença do ME $\lambda_0=1064$ nm .....	117
Figura 57: Espectros Raman experimental e teórico da RP. $\lambda_0=1064$ nm. ....	118
Figura 58: Estrutura otimizada da TC. ....	122
Figura 59: Espectros Raman e SERS da TC adsorvida sobre os coloides B1 e A1 utilizando diferentes radiações excitantes .....	123
Figura 60: Espectros UV-VIS das soluções de TC em diferentes concentrações .....	126
Figura 61: Espectros UV-VIS das soluções de TC normalizados. ....	127
Figura 62: Espectros UV-VIS da solução de TC, da suspensão de AgNP e da suspensão de AgNP na presença de TC centrifugadas a 19 000 rpm.....	128
Figura 63: Espectros UV-VIS da suspensão coloidal B1 na ausência e presença de TC e da solução de TC .....	129
Figura 64: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 80,40 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 24 h de interação	131
Figura 65: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 80,40 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 48 h de interação	132
Figura 66: Agregação das AgNP com a variação da concentração .....	132

Figura 67: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 2, 0,2 e 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 48 h de interação	133
Figura 68: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 2, 0,2 e 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 24 h de interação	134
Figura 69: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 2, 0,2 e 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 48 h de interação	135
Figura 70: Fotomicrografias das células de fibroblastos bovino na ausência e presença do tratamento ternário AgNP+QUIT+TC .....	137
Figura 71: Fotomicrografias das células de fibroblastos bovino na presença do tratamento binário AgNP+QUIT .....	138
Figura 72: Fotomicrografias das células de fibroblastos bovino na presença dos tratamentos AgNP e TC.....	139
Figura 73: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da bactéria <i>K. pneumoniae</i> na ausência (A) e na presença (B) e (C) das AgNPs; e da bactéria <i>S. aureus</i> na ausência (D) e na presença (E) e (F) das AgNPs .....	141
Figura 74: Mecanismos do espalhamento Raman .....	155

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atribuições vibracionais do espectro Raman do TI obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada.....	76
Tabela 2: Atribuição vibracional dos espectros SERS do TI adsorvido sobre AgNP na ausência, na presença de 2-mercaptoetanol e ácido clorídrico obtidas a partir de cálculos teóricos do TI interagindo com 2 átomos de prata. ....	79
Tabela 3: Atribuições vibracionais do espectro Raman do MT obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada.....	89
Tabela 4: Atribuição vibracional dos espectros SERS do MT adsorvido sobre AgNP na ausência, na presença de 2-mercaptoetanol e PVA obtidas a partir de cálculos teóricos do MT interagindo com 2 átomos de prata.....	92
Tabela 5: Atribuições vibracionais do espectro Raman do AZ obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada.....	102
Tabela 6: Atribuição vibracional dos espectros SERS do AZ <sup>2-</sup> adsorvido sobre AgNP na ausência e na presença de 2-mercaptoetanol obtidas a partir de cálculos teóricos do AZ <sup>2-</sup> interagindo com 2 átomos de prata.....	105
Tabela 7: Atribuição vibracional dos espectros SERS da RP na presença dos modificadores de superfície 2-mercaptoetanol ou cloreto de potássio.....	114
Tabela 8: Atribuições vibracionais do espectro Raman da RP obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada.....	119
Tabela 9: Atribuição vibracional do espectro Raman e dos espectros SERS da TC obtidos a partir dos dados experimentais.....	124

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNP – nanopartícula de prata

Am - amida

Ant – estiramento antissimétrico

AuNP - nanopartícula de ouro

AZ – aztreonam

c.a. – cerca de

Carb – ácido carboxílico

CIM – concentração inibitória mínima

Cl – cadeia lateral

DFT- Teoria do funcional de densidade

DLS – espalhamento dinâmico de luz

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

EDX – espectroscopia de raio X por dispersão de energia

et al. – e colaboradores

HOMO - orbital molecular ocupado de mais alta energia

Im – anel imidazólico

LSPR – ressonância do plásmon de superfície localizado

LUMO - orbital molecular desocupado de menor energia

ME – 2-mercaptoetanol

MT – metronidazol

MTT - brometo de 3, (-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

Oop – fora do plano

Ox – oxima protegida

PEG – polietilenoglicol

PMMA - polímeros polimetilmetacrilato

PVA – polivinil álcool

QUIT – quitosana

ROS – espécies reativas de oxigênio

RP – rifampicina

RR – Raman ressonante

Sci – tesoura

SEM – microscopia eletrônica de varredura

SERS – espectroscopia de espalhamento Raman intensificada por superfície

SERRS – espectroscopia de espalhamento Raman ressonante intensificada por superfície

Sh – ombro

Sim – estiramento simétrico

Sk1 – esqueleto

TC – tetraciclina

TEM – microscopia eletrônica de transmissão

Ti – anel tiazólico

TI – tinidazol

UV-VIS – espectroscopia de absorção nas regiões do ultravioleta e visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$  - anel  $\beta$ -lactâmico

$\delta$  - deformação angular

$\upsilon$  - estiramento

$\tau$  - twiste

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
1.1. O USO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO OU PRATA: CONTEXTO HISTÓRICO .....	22
1.2. MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	24
1.3. AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÍON AG+ E DAS AGNP .....	25
1.4. CITOTOXICIDADE DAS AGNP .....	28
1.5. QUITOSANA (QUIT) .....	30
1.6. ESPECTROSCOPIA SERS .....	30
1.7. APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA SERS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	38
1.8. MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES METÁLICAS POR MOLÉCULAS ORGÂNICAS E INORGÂNICAS .....	41
1.9. TINIDAZOL (TI).....	42
1.10. METRONIDAZOL (MT) .....	43
1.11. AZTREONAM (AZ).....	44
1.12. RIFAMPICINA (RP) .....	45
1.13. TETRACICLINA (TC).....	46
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	48
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>49</b>
3.1 MATERIAIS .....	49
3.2. SÍNTESE DAS AGNP ANISOTRÓPICAS .....	49
<b>3.2.1. Método A1: coloides A1.1, A1.2, A1.3, A1.4 e A1.5.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.2. Método A2.....</b>	<b>49</b>

<b>3.2.3. Método B: coloides B1, B2, B3 e B4.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.4. Método C.....</b>	<b>51</b>
3.3. INSTRUMENTAÇÃO.....	51
3.4. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ E POTENCIAL ZETA .....	53
3.5. CENTRIFUGAÇÃO DAS AGNP+QUIT .....	53
3.6. CÁLCULOS TEÓRICOS DOS ANTIBIÓTICOS.....	53
3.7. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DAS AGNPS FRENTE AS CÉLULAS DE FIBROBLASTOS BOVINOS	54
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>56</b>
4.1. ESPECTROS UV-VIS DOS COLOIDES SINTETIZADOS DE ACORDO COM O MÉTODO A1 .....	56
4.2. ESPECTROS UV-VIS DOS COLOIDES SINTETIZADOS DE ACORDO COM O MÉTODO A2 .....	60
4.3. ESPECTROS UV-VIS DOS COLOIDES SINTETIZADOS DE ACORDO COM O MÉTODO B .....	63
4.4. ESPECTROS UV-VIS DO COLOIDE SINTETIZADO DE ACORDO COM O MÉTODO C. ....	65
4.5. ESPECTROSCOPIA SERS E UV-VIS .....	66
<b>4.5.1. Mercaptoetanol.....</b>	<b>67</b>
<b>4.5.2. Polivinil álcool PVA .....</b>	<b>69</b>
<b>4.5.3. Tinidazol (TI).....</b>	<b>71</b>
<b>4.5.4. Metronidazol (MT).....</b>	<b>84</b>
<b>4.5.5. Aztreonam (AZ).....</b>	<b>97</b>
<b>4.5.6. Rifampicina (RP).....</b>	<b>108</b>
4.6. EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS .....	130
<b>4.6.1. Citotoxicidade das AgNP frente células de fibroblastos bovinos.....</b>	<b>130</b>
<b>4.6.2. Estudo das interações das AgNPs em células bacterianas.....</b>	<b>141</b>
<b>5.CONCLUSÕES .....</b>	<b>142</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>144</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>154</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>159</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O USO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO OU PRATA: CONTEXTO HISTÓRICO

Nanopartículas de ouro (AuNP) e nanopartículas de prata (AgNP) são conhecidas e amplamente estudadas em diversas áreas por apresentarem propriedades características tais como comportamento espectroscópico variável (MOSKOVITS, 2005), maior área superficial (COBLEY et al., 2011) e oscilação coletiva dos elétrons livres na interface metal dielétrico (PELTON; AIZPURUA; BRYANT, 2008). O que faz com que a frequência da luz incidente coincida com a frequência de oscilação dos elétrons, originando a ressonância do plásmon de superfície localizado (LSPR – *localized surface plasmon resonance*) (WILLETS; VAN DUYN, 2007).

Essas nanopartículas foram utilizadas desde o império Romano, para decorar vitrais de igreja, e em especial a taça de Lycurgo (FREESTONE et al., 2007). A taça de Lycurgo apresenta uma tonalidade verde quando reflete a luz do sol, devido à presença de AgNP, e vermelha quando transmite a luz, devido à presença das AuNP (FREESTONE et al., 2007). Apesar das mesmas terem sido utilizadas desde os tempos antigos, o trabalho pioneiro que descreve o comportamento ótico de AuNP foi realizado por Faraday no século XIX (FARADAY, 1857). Posteriormente dois trabalhos independentes Turkevich *et al.* (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951) aprimoraram a síntese dessas nanopartículas, utilizando citrato como agente redutor e Frens variando a proporção de agente redutor verificou a formação de AuNP de diversos tamanhos (FRENS, 1973). Para a síntese de AgNP destacam-se os trabalhos de Lee e Meisel (LEE, P. C.; MEISEL, 1982) e o trabalho de Creighton *et al.* (CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G., 1979) que abordavam sínteses de diferentes formatos e tamanhos quando reduzidas na presença do citrato ou borohidreto de sódio, respectivamente. Atualmente, o desenvolvimento dessas sínteses leva ao desenvolvimento de novas tecnologias e aplicações (ORENDORFF et al., 2005). Essas possuem capacidade de localizar campo elétrico, o que permite o uso da técnica de espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS).

Dentre as aplicações biomédicas, estas se destacam devido a sua fácil modificação com anticorpos e outras biomoléculas que permitem uma maior biocompatibilidade dos sistemas estudados. As AgNP são conhecidas por suas propriedades antibacterianas, enquanto que as AuNP são mais empregadas em sistemas de carreamento de fármacos, diagnóstico de doenças, terapia fototérmica e teragnosis que envolve o diagnóstico e tratamento de uma determinada doença simultaneamente.

A prata em suas diversas formas químicas é conhecida por suas propriedades antibacterianas, e seu poder como agente antimicrobiano foi utilizado desde as civilizações gregas e romanas antigas com a finalidade de desinfetar água e comidas. (KONOP et al., 2016). Em 1520 Paracelsus utilizou a prata e o nitrato de prata para o tratamento de feridas (CASTELLANO et al., 2007). Entre 1700 e 1800 nitrato de prata foi utilizado para tratar várias infecções, como úlcera e acne (ALEXANDER, 2009). Em 1920, foi aprovada pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA) a primeira formulação baseada em prata iônica para usos medicinais, enquanto que para AgNP o primeiro registro nesta organização é datado de 1954 (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011). Em 2011, 53 % dos produtos que tinham em sua composição prata eram constituídos de nanopartículas (NOWACK et al., 2011). Atualmente, a introdução de novos materiais compostos de nanopartículas incorporadas com antibióticos se tornou relevante, devido ao desenvolvimento de resistência a diversos antibióticos o que passou a representar importância considerável em saúde pública (SHAHVERDI, AHMAD R. et al., 2007).

O ouro por sua vez, foi utilizado desde a idade média nos laboratórios dos alquimistas. Paracelsus escreveu sobre as propriedades terapêuticas do ouro, o qual foi utilizado para o tratamento de doenças mentais e sífilis. O primeiro livro sobre o ouro coloidal foi publicado em 1618 pelo filósofo e doutor de medicina Francisco Antonii, o qual abordava a síntese das nanopartículas de ouro e suas aplicações na medicina. (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2011) A revolução na “imunoquímica” associada com o uso de AuNP em estudos biológicos ocorreu em 1971, quando Faulk e colaboradores descreveram um método para a bioconjugação de anticorpos adsorvidos sobre AuNP (PAGE FAULK; MALCOLM TAYLOR, 1971).

Nos dia de hoje, muitos estudos são direcionados, na aplicação dessas nanopartículas conjugadas com biomacromoléculas de reconhecimento (anticorpos, lectinas, enzimas, apatâmeros, etc.). Nesse sentido, a espectroscopia SERS é uma

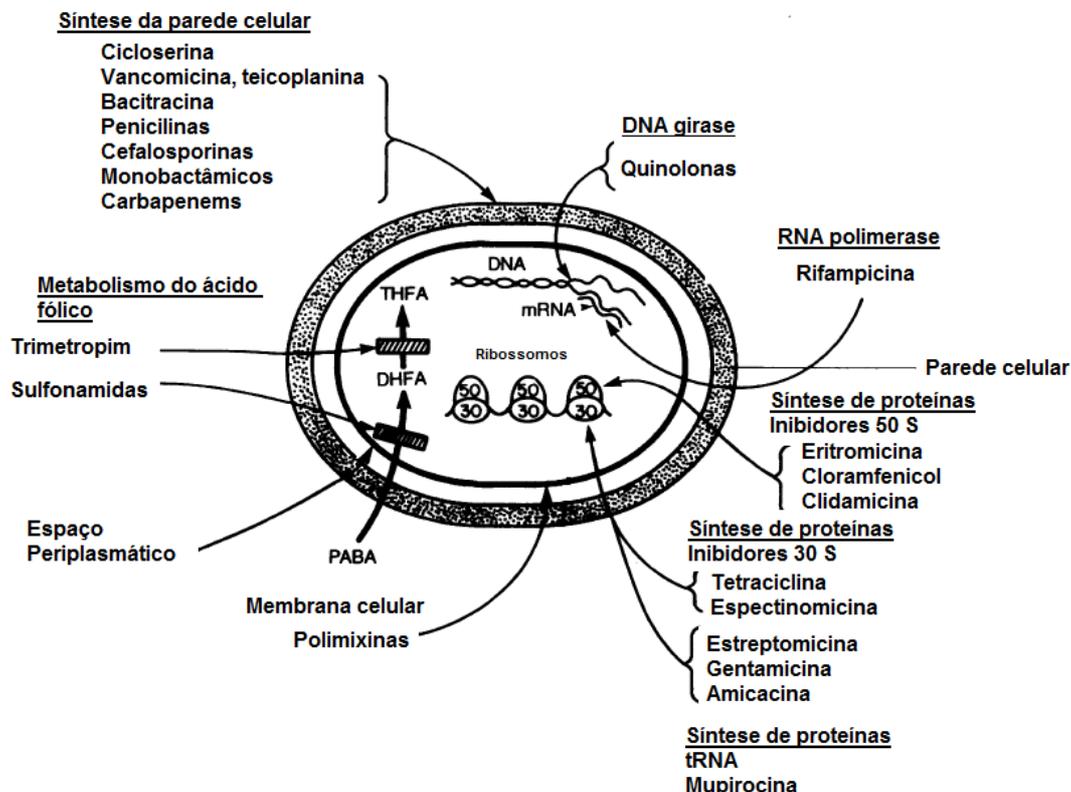
ferramenta que permite estudar as interações dessas biomoléculas com superfícies de prata ou ouro.

## 1.2. MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

O descobrimento dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária. Eles são importantes na redução da mortalidade por doenças infecciosas. Os antibióticos podem ser classificados como bacteriostáticos, quando agem inibindo o crescimento e a duplicação dos microorganismos, podendo estes voltar a crescer com a suspensão do antibiótico; ou ainda, como bactericidas, quando agem com efeito letal sobre os microorganismos (DAVIES; DAVIES, 2010).

Dentre os mecanismos de ação destes destacam-se a inibição da síntese da parede celular, a inibição da síntese de proteínas, a alteração da membrana citoplasmática, por inibidores da síntese dos ácidos nucléicos e a alteração do metabolismo do ácido fólico (PABA) (NEU, 1992). A Figura 1 mostra os mecanismos de ação de diversas classes de antibióticos.

Figura 1: Mecanismo de ação de diversas classes de antibióticos na célula bacteriana



Fonte: adaptado NEU, 1992

O uso excessivo e impróprio dos antibióticos levou a seleção de bactérias resistentes que se disseminaram por todo o planeta. Esta resistência é adquirida devido ao fato dos microorganismos conseguirem se adaptar, por mecanismos de aquisição e transferência de genes (COHEN; CHANG; HSU, 1972) (DATSENKO; WANNER, 2000).

As infecções causadas por microorganismos resistentes tendem a responder cada vez menos à terapêutica, resultando em tratamentos mais longos, com custos mais elevados e risco de morte.

O desenvolvimento de resistência adquirida pela bactéria *Staphylococcus aureus* frente a penicilina G ocorreu em 1944. A penicilina G é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico que age por inibição da síntese da parede celular de bactérias, impedindo ligações cruzadas entre as fitas de peptidoglicano se formem. As bactérias se tornavam resistentes devido ao desenvolvimento da síntese da enzima  $\beta$ -lactamase que é capaz de destruir as penicilinas (POOLE, 2004).

Atualmente, a resistência bacteriana a antibióticos é descrita em, praticamente todas as espécies de bactérias, conhecendo-se detalhes dos mecanismos de aquisição de resistência e dos mecanismos moleculares de manifestação da resistência. Esta pode ocorrer por inativação do antibiótico, prevenção de acesso ao sítio ativo e também através da alteração do sítio ativo do antibiótico (LEVY; MARSHALL, 2004).

Logo, o fenômeno de resistência impõe limitações ao tratamento de diversas infecções, o que torna imprescindível a descoberta de novos agentes antibacterianos. Nesse sentido, várias pesquisas são direcionadas na descoberta de novos antibióticos (TATARKIEWICZ; STANISZEWSKA; BUJALSKA-ZADRONY, 2016). As AgNP têm seu potencial uso como agente antisséptico, sendo portanto uma alternativa propícia para o combate à resistência adquirida pelos microorganismos (KHAN; MUSARRAT; AL-KHEDHAIRY, 2016). A próxima seção será dedicada a compreensão dos mecanismos de ação antibacterianos das AgNP.

### 1.3. AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÍON $Ag^+$ E DAS AGNP

A prata possui um amplo espectro de ação contra linhagens de bactérias *Gram positivas* e *Gram negativas* (DUNN; EDWARDS-JONES, 2004). O mecanismo exato de ação da prata em meio biológico não é conhecido. Porém os possíveis mecanismos da prata, da prata iônica e das AgNP nas células bacterianas é estabelecido de acordo com as mudanças na morfologia e estrutura dessas células.

A prata em forma de volume metálico (*bulk*) é considerada quimicamente inativa, uma vez que esta não adsorve facilmente sobre as células bacterianas (RUSSELL; HUGO, 1994). A ionização da espécie *bulk* permite que esta adquira propriedades antibacterianas. No interior da célula os íons prata (I) interagem com proteínas estruturais e proteínas das enzimas. Os íons prata (I) interagem rapidamente com os grupos tiol, amino, imidazol, fosfato e carbonila presentes na membrana celular ou nas enzimas dos microorganismos (IP et al., 2006). Durante a interação os átomos de hidrogênio presentes nestes grupos funcionais são substituídos pelo íon prata (I), criando ligações Ag-S, Ag-N ou Ag-O (FENG et al., 2000). O íon prata (I) é capaz ainda de formar complexos com os ácidos nucleicos bloqueando a transcrição do DNA e RNA. A ligação aos componentes da membrana celular interrompe a respiração bacteriana e a síntese da adenosina trifosfato (MADHUMATHI et al., 2010).

As AgNP, por sua vez apresentam uma ação antibacteriana melhorada sendo isto devido ao fácil monitoramento do tamanho e forma das mesmas. Na literatura, existem vários estudos que são direcionados para a intensificação do efeito antibacteriano e os possíveis mecanismos de ação destas nanopartículas. Dentre esses, destacam-se a otimização do tamanho e forma das nanopartículas, a estabilização dessas em meio biológico e a modificação das sínteses das mesmas de forma a diminuir os efeitos tóxicos associados a elas (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

A maximização do efeito antibacteriano através do aumento da área superficial da AgNP sintetizada foi reportada por Morones *et al.* Os autores mostraram através da técnica de microscopia eletrônica de varredura que AgNP com tamanhos de 1-10 nm se acumulam mais na célula bacteriana, ou seja apresentam o efeito antibacteriano melhorado, em comparação com AgNP com tamanhos da ordem de 100 nm (MORONES et al., 2005).

O efeito da forma das AgNP na ação antibacteriana foi reportado por Pal *et al.* Os autores mostraram que nanopartículas de tamanhos triangulares apresentam facetas (1,1,1) altamente reativas, e devido a isto o efeito antibacteriano é maximizado quando comparado com nanoesferas e nanobastões (PAL; TAK; SONG, 2007).

Atualmente, muitas AgNP são sintetizadas na presença de polímeros, que são considerados bons materiais para o preparo das AgNP, e também excelentes agentes estabilizadores quando comparadas com citrato ou outros solventes orgânicos (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). He *et al.* obtiveram AgNP através da redução

AgNO<sub>3</sub> com o polímero polivinil pirrolidona (PVP) utilizando radiação microondas, produzindo AgNP com uma distribuição estreita de tamanhos (HE, R. et al., 2002). Vários métodos utilizam polivinil álcool (PVA), devido ao fato deste polímero ser biocompatível e apresentar baixa citotoxicidade, permitindo uma ampla aplicação na área biomédica (BADR; MAHMOUD, 2006). É relevante ainda, o uso de outros polímeros que aumentam a biocompatibilidade dessas AgNP, em particular a quitosana (QUIT) (SHI et al., 2006). A QUIT é um biopolímero que também apresenta ação antibacteriana. É conhecido que a combinação de AgNP com este polímero pode promover um efeito de sinergia na ação antibacteriana, de forma que o efeito da combinação é maior que a soma dos efeitos de cada um dos agentes aplicados isoladamente. Uma breve discussão sobre a QUIT e o mecanismo de ação frente as células bacterianas está apresentado na seção 1.5.

Quando tratamos dos mecanismos de ação dessas AgNP é relatado na literatura que essas interagem com a membrana celular das bactérias formando agregados e causando danos na sua estrutura, o que facilita a entrada das AgNP dentro da célula (MORONES et al., 2005). Outros autores citam que estas são capazes de liberar íons Ag<sup>+</sup>, apresentando dessa forma, um efeito muito similar ao íon, no qual a membrana celular das bactérias contém proteínas, o que faz com que as AgNP interajam com essas proteínas, bem como com estruturas que contém átomos de fósforo, como DNA. Outros trabalhos abordam a geração de espécies de oxigênio reativas (ROS – *reactive oxygen species*) que danificam a estrutura celular, desde os lipídios da membrana até o DNA. Vários estudos, relatam a observação dessas ROS nas células tratadas com AgNP, e nessas condições, as células não suportam um alto *stress* oxidativo o que leva a inativação celular (LE OUAY; STELLACCI, 2015).

Além do conhecimento dos mecanismos de ação das AgNP e como controlar suas propriedades para intensificar os efeitos antibacterianos, muitas outras pesquisas são direcionadas no sentido de se combinar essas AgNP com agentes que também possuem ação antibacteriana, promovendo assim efeitos de sinergia na ação antibacteriana.

Morones- Ramires *et al.*, citam em seu trabalho que a combinação do íon prata e antibióticos restaura a susceptibilidade antibiótica contra linhagens de bactérias resistentes. Os autores mostraram que tanto para os testes realizados *in vitro*, quanto para os realizados *in vivo* em camundongos que a habilidade da prata em produzir

*stress* oxidativo pode ser aproveitada para potencializar a atividade antibiótica (MORONES-RAMIREZ et al., 2013).

O trabalho pioneiro utilizando a combinação de AgNP e antibióticos foi relatado por Shahverdi *et al.*. Os autores mostraram um processo de redução do íon  $\text{Ag}^+$  com cultura da bactéria *Klebsiella pneumoniae* e a avaliação das propriedades antibacterianas das AgNPs obtidas contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A formação das AgNP foi avaliada pela técnica espectroscópica UV-VIS, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e espectroscopia de raio X por dispersão de energia (EDS). A atividade antibacteriana da penicilina G, amoxicilina, eritromicina, clidamicina e vancomicina foi intensificada na presença das AgNP (SHAHVERDI, A. R. et al., 2007).

Singh *et al.* sintetizaram AgNP baseando-se em métodos não tóxicos através da redução do íon utilizando um extrato de célula de *Acinetobactéria*. O potencial sinérgico das combinações das AgNP e 14 antibióticos foi testado contra 7 patógenos e determinado por difusão em disco e concentração inibitória mínima (CIM) (SINGH et al., 2013).

Kora *et al.* sintetizaram AgNP utilizando borohidreto de sódio, estabilizadas com citrato de sódio, dodecilsulfato de sódio e PVP. Os autores avaliaram a ação antibacteriana dessas AgNP quando combinadas com os antibióticos estreptomicina, ampicilina e tetraciclina. A atividade dos três antibióticos testados foi intensificada quando houve combinação com as AgNP estabilizadas, sendo que os melhores resultados foram obtidos para as AgNP recobertas com PVP quando comparada com as AgNP recobertas com dodecilsulfato de sódio e citrato (KORA; RASTOGI, 2013).

#### 1.4. CITOTOXICIDADE DAS AGNP

As AgNP apresentam elevada ação antibacteriana, e são potenciais candidatas para o controle da resistência adquirida pelas bactérias frente aos antibióticos. No entanto, é necessário o conhecimento dos riscos potenciais desses nanomateriais para a saúde humana e animal. A nanotoxicologia estuda a citotoxicidade dos nanomateriais a medida que a sua utilização pode causar riscos para o meio ambiente e para saúde humana e animal (NAHA; CHHOUR; CORMODE, 2015). Os testes de citotoxicidade podem ser realizados em culturas de células (*in vitro*) ou com organismos vivos (*in vivo*).

O exemplo mais comum de citotoxicidade das AgNP é devido ao fato dessas causarem argiria. A argiria é uma doença que é devida a absorção dos íons prata pela via digestiva ou respiratória, sendo estes capazes de precipitar proteínas na coloração azul / acinzentada (MERCHANT; CARPENTER, 2011).

A citotoxicidade das AgNP varia de acordo com sua composição, concentração, forma e tamanho (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012). Dependendo destes fatores, as AgNP podem promover danos as células, através da produção de espécies de oxigênio reativas (ROS) e, conseqüentemente, stress oxidativo. A geração de stress oxidativo pelas células pode causar danos aos lipídeos e DNA das células, gerando assim uma resposta inflamatória (GIUSTARINI et al., 2009).

Nesse sentido, várias pesquisas são direcionadas na observação de efeitos citotóxicos das AgNPs. No quadro 1 encontram-se alguns trabalhos que citam os efeitos citotóxicos das AgNP.

Quadro 1: Estudos sobre os efeitos citotóxicos das AgNP

Células	Dose / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Tamanho / nm	Tempo de exposição / h	Efeito	Referência
Fibroblastos de pele humana	$\leq 25$	5-20	24	Não apresentou efeito citotóxico nestas concentrações	(GALANDAKOVA et al., 2016)
Queratinócitos / fibroblastos de camundongo	1-108	27	24	Danos ao DNA / apoptose e necrose	(JIRAVOVA et al., 2016)
Monócitos humanos	50-100	$34 \pm 3,5$	1-24	Citocina pro inflamatória interleucina 1, interleucina 6 e necrose tumoral	(MURPHY et al., 2016)
Macrófagos de camundongos / epiteliais humanas	Citotoxicidade dose independente 1-250	$20,2 \pm 0,5$	24	Citocina pro inflamatória / ROS e apoptose celular	(NGUYEN et al., 2016)
Fibroblastos humanos	3,5-56	5-20	48	Não apresentou citotoxicidade em concentrações inferiores a $56 \mu\text{g.mL}^{-1}$	(DAI et al., 2016)

Dessa forma, é imprescindível o conhecimento da citotoxicidade das AgNP para posterior aplicação dessas *in vivo*. É conhecido que sob baixas concentrações essas AgNP apresentam baixa citotoxicidade (GALANDAKOVA et al., 2016). Em nosso trabalho prévio, verificamos que a interação de AgNP, QUIT e antibióticos promovia

um efeito de sinergia na ação antibacteriana (FILGUEIRAS A.L., 2013). Os valores de concentração inibitória mínima para as combinações variaram 0,06 - 8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Além disso, não existem trabalhos publicados na literatura que mostram o efeito de citotoxicidade quando há a combinação de AgNP, QUIT e antibióticos. Neste trabalho, foi estudado o efeito de citotoxicidade dessa combinação através do ensaio colorimétrico utilizando o MTT brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium] para avaliar a viabilidade celular.

### 1.5. QUITOSANA (QUIT)

A QUIT é um polímero natural obtido da desacetilação alcalina parcial da quitina, constituída por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ . Ela é uma base de Lewis forte devido a presença de grupos amino primário apresentando valor de  $\text{pK}_a \approx 6,3$ , o que a torna solúvel em ácidos orgânicos diluídos e insolúvel em água (USMAN et al., 2016).

A QUIT é um polímero muito versátil com aplicações nas indústrias cosmética, alimentícia, agente de floculação no tratamento de água e potencial uso como agente antibacteriano. A presença de grupos amino e hidroxila em sua estrutura permite a interação desta com íons metálicos, o que a torna eficaz como agente estabilizante de suspensões coloidais metálicas. Além disso, exibe alta atividade antibacteriana sendo também atóxica, biodegradável e biocompatível (JAYAKUMAR et al., 2010).

O mecanismo de ação mais aceito na literatura é associado à presença dos grupos amino pertencentes à sua estrutura, que quando solubilizadas em meio ácido conferem as moléculas de QUIT uma carga positiva, que interagem facilmente com a carga negativa da membrana celular das bactérias. Esta interação altera a permeabilidade celular, o que permite o vazamento dos constituintes intracelulares (RABEA et al., 2003).

Devido a essas propriedades, neste trabalho a QUIT foi escolhida como polímero utilizado não só como agente estabilizante das suspensões de AgNP, mas também por suas propriedades antibacterianas e por ser um polímero biocompatível.

### 1.6. ESPECTROSCOPIA SERS

O efeito do espalhamento de luz inelástico após uma radiação monocromática atingir uma amostra foi descoberto em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman e é

denominado de espectroscopia Raman. Os aspectos teóricos da espectroscopia Raman estão apresentados no anexo 1 (RAMAN; KRISHNAN, 1998).

O espalhamento Raman intensificado por superfície foi descoberto em 1974 por Fleischman *et al.* através do estudo de piridina adsorvida em eletrodo de prata. Durante estes experimentos, os autores observaram que os espectros obtidos apresentavam uma relação sinal ruído significativamente melhor quando comparado ao espectro Raman normal da piridina. Inicialmente esta intensificação foi atribuída ao aumento da área superficial do eletrodo, que promovia um aumento do número de moléculas adsorvidas sobre a superfície metálica (FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974). No entanto, dois trabalhos posteriores mostraram que a intensificação devida ao aumento da área superficial do eletrodo era da ordem de  $10^2$  vezes, enquanto que a intensificação observada pelo experimento era da ordem de  $10^6$  vezes (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977; JEANMAIRE; VANDUYNE, 1977).

Caracterizado um novo efeito, inúmeros trabalhos foram publicados tentando explicar os processos envolvidos na intensificação do espectro. Dentre os diversos modelos propostos, os mais aceitos para explicar tal fenômeno são o modelo eletromagnético e o modelo químico (MOSKOVITS, 1985). O modelo eletromagnético é o responsável pela intensificação do campo eletromagnético próximo à superfície metálica através da ressonância com o plásmon de superfície. Enquanto, que o modelo químico envolve a interação do adsorbato com a superfície metálica através da formação de um complexo de superfície. Há várias revisões na literatura apresentando os diferentes modelos que explicam a intensificação dos sinais Raman de moléculas adsorvidas sobre os metais prata, ouro e cobre, e todas aceitam que os dois modelos estão envolvidos na explicação de tal intensificação (DE FARIA; TEMPERINI; SALA, 1999; HAO; SCHATZ, 2004; ITOH *et al.*, 2011; OTTO, A., 2005).

### **O modelo Eletromagnético**

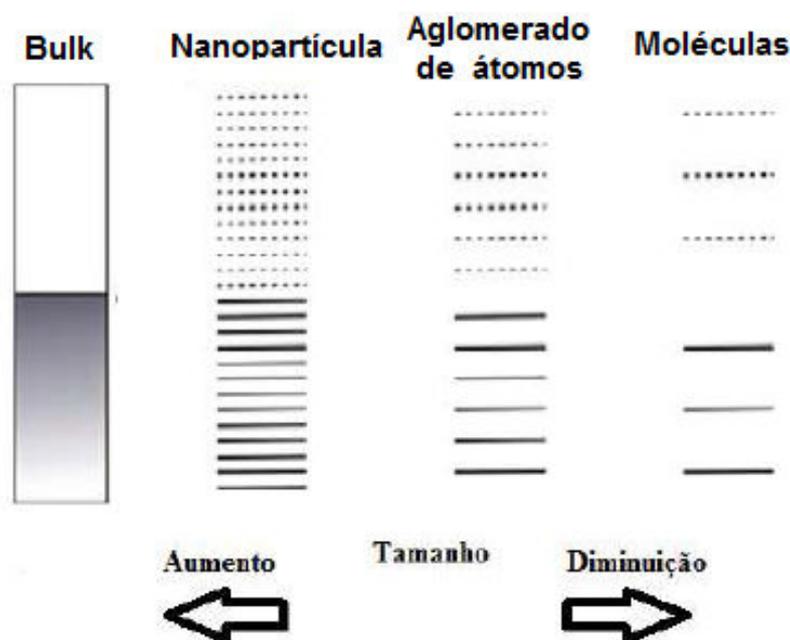
A compreensão do efeito SERS segundo este modelo envolve a intensificação do campo eletromagnético sem que haja necessidade de sobreposição eletrônica entre o metal e o adsorbato. Para entendermos tal modelo é necessário conhecermos a ressonância com o plásmon de superfície (ANDRADE; BROLO; TEMPERINI, 2008).

A excitação dos elétrons de superfície de uma nanopartícula metálica através da incidência de radiação eletromagnética com comprimento de onda ressonante é

conhecida como ressonância do plásmon de superfície localizado (LSPR – *localized surface plasmon resonance*) (HUTTER; FENDLER, 2004).

Em metais as bandas de energia eletrônica, originam-se do arranjo cristalino dos átomos. A separação entre as bandas de energia eletrônica depende da quantidade de átomos presente no sistema estudado. Se tomarmos átomos isolados ou moléculas, seus estados eletrônicos serão discretos. Porém, o aumento do número de átomos, promove uma combinação adicional dos orbitais atômicos do metal, ocorrendo a formação de bandas de energia. Se aumentarmos ainda mais, o número de átomos, os níveis de energia se aproximam ainda mais se tornando cada vez mais contínuos. A partir do momento que temos um volume metálico (bulk), as bandas de energia se tornam contínuas. A Figura 2 mostra esta abordagem, conforme se aumenta o número de átomos a diferença entre os níveis de energia diminui, até que as bandas de energia se tornem contínuas (MORTON; SILVERSTEIN; JENSEN, 2011).

Figura 2: Evolução dos níveis de energia eletrônicos em materiais metálicos.



Fonte: adaptado de MORTON *et al.* 2011

A mudança de um estado volumétrico (bulk) para um estado nanométrico irá interferir nos estados eletrônicos do metal, modificando assim, as propriedades óticas da nanopartícula. Tal mudança permite a transição eletrônica entre a banda de valência de maior energia ocupada para a banda de condução de menor energia desocupada,

caracterizando o efeito LSPR. Logo, para estudar os efeitos plasmônicos e SERS de um determinado metal é de extrema importância conhecer a resposta ótica desses metais (LERU; ETCHEGOIN, 2009).

O modelo de Drude é o mais simples para explicar a dinâmica dos elétrons em materiais metálicos. Segundo este modelo a função dielétrica dos elétrons livres de um metal pode ser escrita de acordo com a seguinte equação:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} \left( 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_0\omega} \right) \quad (1)$$

Nesta equação  $\gamma_0$  é o fator de amortecimento,  $\varepsilon_{\infty}$  é uma resposta ótica de fundo da parte real da função dielétrica associada aos íons positivos e  $\omega_p$  é a frequência do plasma dada pela seguinte equação:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m\varepsilon_0\varepsilon_{\infty}}} \quad (2)$$

Nesta equação  $n$  é o número de elétrons livres por unidade de volume e  $m$  é a massa do elétron. A equação 1 pode ser escrita em função de uma parte real e uma parte imaginária. Dessa forma:

$$\text{Re}(\varepsilon(\omega)) = \varepsilon_{\infty} \left( 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - \gamma_0^2} \right) \quad (3)$$

$$\text{Im}(\varepsilon(\omega)) = \frac{\varepsilon_{\infty}\omega_p^2\gamma_0}{\omega(\omega^2 + \gamma_0^2)} \quad (4)$$

Nas equações de 1, 3 e 4, o fator de amortecimento  $\gamma_0$  é pequeno quando comparado com  $\omega$ , e o valor de  $\omega$  se aproxima ao valor  $\omega_p$ , o que leva a valores de  $\text{Re}(\varepsilon(\omega)) \approx 0$ . Em frequências na região onde  $\omega < \omega_p$  a parte real adquire valores negativos, ou seja,  $\text{Re}(\varepsilon(\omega)) < 0$ . A parte imaginária da função dielétrica corresponde à absorção da luz e, quando  $\omega$  se aproxima de  $\omega_p$ ,  $\omega$  adquire valores não muito pequenos o que leva a um valor da parte imaginária pequeno (LERU; ETCHEGOIN, 2009).

A interação da radiação eletromagnética com a superfície metálica pode ser resolvida se a partícula metálica for muito menor que o comprimento de onda da radiação incidente (LERU; ETCHEGOIN, 2009). Neste caso, o campo elétrico dentro da partícula ( $E_{In}$ ) fica:

$$E_{In} = \frac{3\varepsilon_M}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_M} E_0 \quad (5)$$

Nesta equação  $\varepsilon_M$  é a constante dielétrica do meio,  $\varepsilon(\omega)$  é a função dielétrica do metal que é descrita como a soma de uma parte real e outra imaginária e  $E_0$  é o campo da radiação incidente.

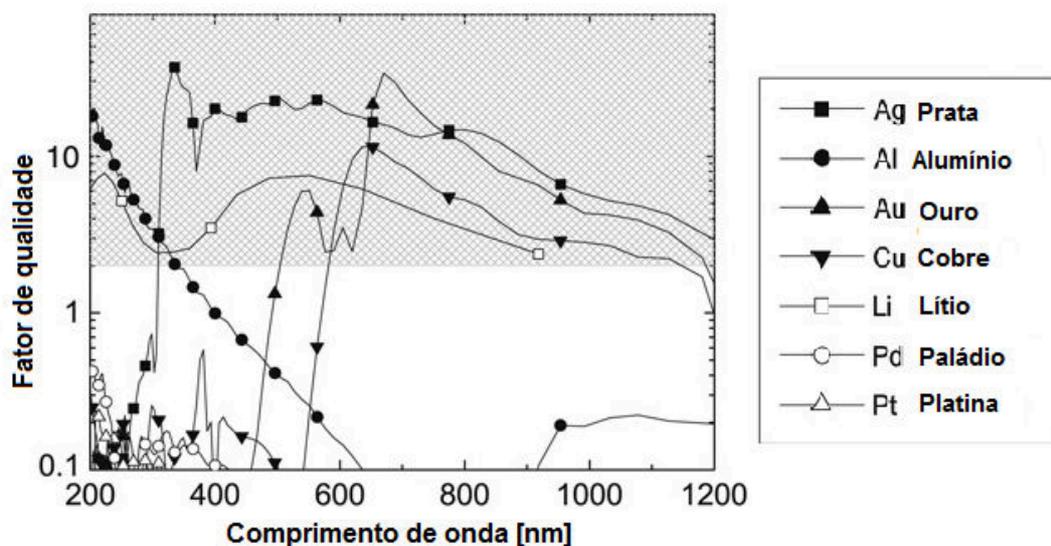
O campo elétrico no interior da partícula será tão maior quanto mais próximo de zero for o denominador da equação (5), o que é alcançado quando  $\varepsilon(\omega) \approx -2\varepsilon_M$  que é conhecida como condição de ressonância. Em um bom substrato SERS, essa condição é atingida quando a parte real da função dielétrica for negativa, enquanto que a parte imaginária deve apresentar o menor valor possível. A partir desse modelo, foi possível elaborar um fator de qualidade SERS que relaciona o metal e o comprimento de onda da radiação excitante. O fator de qualidade SERS é definido pela seguinte equação:

$$Q = \frac{\omega(d[Re(\varepsilon(\omega))]/d\omega)}{2[Im(\varepsilon(\omega))]^2} \quad (6)$$

Onde  $Re(\varepsilon(\omega))$  e  $Im(\varepsilon(\omega))$  são a parte real e imaginária da função dielétrica.

A análise do fator de qualidade determina se um substrato é ou não adequado para obtenção de um espectro SERS, sendo esta condição atingida quando o valor de tal fator for igual ou superior a 2. Sendo assim, entre 200 e 400 nm destaca-se o alumínio, o lítio poderia ser utilizado até 900 nm, a prata a partir de 300 nm, o ouro a partir de 500 nm e o cobre a partir de 600 nm. A Figura 3 mostra o valor deste fator de qualidade para diferentes metais na região entre 200 e 1200 nm (LERU; ETCHEGOIN, 2009).

Figura 3: Fator de qualidade de diferentes metais



Valores previstos ao longo da faixa de comprimento de onda de 200 a 1200 nm.

Fonte: adaptado de LE RU e ETCHEGOIN, 2009

A análise da Figura 3 mostra o porquê do uso de nanopartículas de prata, ouro e cobre como substratos SERS para a região do visível. A excitação do plásmon de superfície promove intensificação do campo eletromagnético local tanto da radiação incidente, quanto da radiação espalhada, o que leva ao aumento da intensidade Raman. Esse mecanismo foi chamado de mecanismo eletromagnético e responde pela maior parte do fator de intensificação do espalhamento Raman. Em determinadas condições, o campo elétrico local  $E$  pode ser intensificado em uma escala de até  $E^4$  vezes. Esta relação, pode ser explicada de acordo com a equação 7, onde  $I_{SERS(\nu_S)}$  é a intensidade do sinal SERS;  $N$  é o número de moléculas envolvidas no espalhamento SERS,  $I_{(\nu_L)}$  é a intensidade da radiação excitante,  $E_{(\nu_L)}$  é o campo elétrico da radiação incidente,  $E_{(\nu_S)}$  é o campo elétrico da radiação espalhada,  $\sigma_{ads}^R$  é a seção de choque Raman da molécula adsorvida (KNEIPP et al., 1999).

$$I_{SERS} = N(I_{\nu_L})|E(\nu_L)|^2 \cdot |E(\nu_S)|^2 \cdot \sigma_{ads}^R \quad (7)$$

Dessa forma, este mecanismo de ressonância do plásmon é fundamental para a observação do efeito SERS, ou seja, na ausência de tal ressonância o efeito não é observado. Uma consequência importante do mecanismo eletromagnético é a forte dependência da intensificação SERS com o tamanho e a forma das nanopartículas.

O modelo de Drude para explicar a ressonância de plásmon para partículas esféricas isoladas é um modelo bastante simplificado do que é realmente observado

nos experimentos SERS. Na prática, a proximidade entre duas partículas metálicas (*hot spots*), pode ser responsável pelo o aumento do campo elétrico entre essas duas partículas. Desta maneira, uma molécula localizada entre estas duas partículas sofre uma intensificação muito maior do campo, em relação a uma molécula localizada em uma partícula isolada. Esta intensificação depende ainda, que a polarização da radiação incidente seja adequada (LEE, A. et al., 2011). A existência dos “hot spots” permite ainda, a detecção de uma única molécula. Esta descoberta levou a um crescimento significativo no número de artigos científicos publicadas na literatura, o que levou a espectroscopia SERS ao patamar de ferramenta analítica (NIE; EMERY, 1997).

### **O modelo químico**

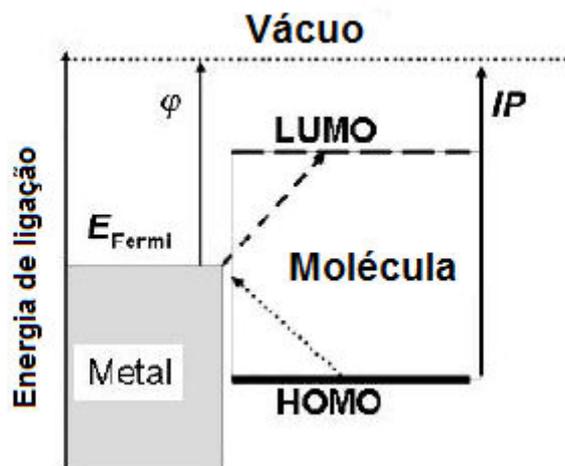
O modelo eletromagnético não prevê a dependência da intensificação com a estrutura molecular, sendo influenciado apenas pelas propriedades dos substratos metálicos.

A intensificação do sinal SERS, segundo o modelo químico, é devida a interação da molécula com o substrato metálico. Esta interação resulta na formação de um complexo de superfície, promovendo transições por transferência de carga entre os estados do metal e os estados próprios da molécula (RUBIM et al., 1995). Neste caso, assume-se que a adsorção das moléculas sobre a superfície metálica provoca uma perturbação nos estados eletrônicos do adsorbato, alargando-se a distribuição energética dos níveis eletrônicos (OTTO, ANDREAS, 2005).

Após o processo de interação entre o adsorbato e a superfície metálica, o nível de Fermi do metal se encontra entre o orbital HOMO (orbital molecular de mais alta energia ocupado) e o orbital LUMO (orbital molecular de menor energia desocupado) do adsorbato. A excitação com comprimento de onda ressonante leva a transição de transferência de carga entre o orbital HOMO do adsorbato e o nível de Fermi do metal, ou entre o nível de Fermi do metal e o orbital LUMO do adsorbato, caracterizando assim o modelo de intensificação química do efeito SERS (AROCA, 2006). Isto significa que a transferência de carga entre o nível de Fermi do metal e os orbitais moleculares só acontece na presença de fótons em ressonância. Esta transferência de carga pode levar à coordenação da molécula com a superfície metálica, e a espécie formada é denominada de complexo de superfície. A Figura 4 ilustra o diagrama de energia envolvido no efeito químico. Logo, o efeito químico pode ser explicado de

forma similar ao efeito Raman ressonante (RR) e as mesmas equações podem ser utilizadas. (AROCA, 2006).

Figura 4: Diagrama de energia ilustrando a banda de energia de nanoestruturas metálicas e os orbitais HOMO e LUMO da molécula adsorvida



IP é o potencial de ionização do adsorbato,  $\phi$  é a função trabalho do metal

Fonte: adaptado de AROCA, 2006

Uma consequência da intensificação química é a mudança na polarizabilidade da molécula, podendo ocasionar variações nos espectros Raman da espécie adsorvida quando comparado com o espectro Raman normal da molécula em solução aquosa. Essa modificação observada no espectro SERS é devida a geometria de adsorção, que pode provocar deslocamentos nas bandas, bem como modificações nas intensidades relativas de algumas bandas no espectro.

A geometria de adsorção de uma molécula em relação a um substrato metálico foi estudada por Moskovits em seu relevante trabalho sobre regra de seleção de superfície (MOSKOVITS, 1982). A partir dessas regras, sabe-se que o espalhamento da luz polarizada por uma superfície metálica é máximo quando a polarização é perpendicular à superfície e mínimo quando é paralelo. Dessa forma, os modos vibracionais que possuem componentes perpendiculares à superfície serão intensificados, o que permite inferir a orientação da molécula adsorvida.

Foram relatados até aqui dois mecanismos separados para se compreender a intensificação dos sinais Raman de moléculas adsorvidas sobre nanopartículas principalmente de ouro, prata e cobre. No entanto, em 2012, Lombardi e Birke obtiveram uma expressão única que associava os termos do plásmon e a transferência

de carga. As regras de seleção propostas neste modelo são similares as anteriores e prevêm corretamente as intensidades relativas do espectro SERS de algumas moléculas (LOMBARDI; BIRKE, 2012).

### 1.7. APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA SERS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Atualmente, o uso das nanopartículas em dispositivos biológicos envolve a modificação das suas superfícies por biomoléculas. O conhecimento das interações de biomoléculas adsorvidas sobre AgNP e AuNP é fundamental para a compreensão do comportamento dessas nanopartículas nos sistemas biológicos. Neste contexto, a espectroscopia de espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS – *Surface enhanced Raman Scattering*) tem-se mostrado uma técnica versátil e de alta sensibilidade, permitindo a detecção de monocamadas adsorvidas, chegando ao nível de detecção de uma única molécula.

Na literatura existem inúmeros trabalhos que utilizam a espectroscopia SERS para a compreensão dos sítios envolvidos na adsorção dessas biomoléculas, bem como o uso da espectroscopia SERS para a detecção e aplicação em sistemas de diagnóstico ou sistemas carreadores.

O espectro SERS do antibiótico benzilpenicilina foi reportado por Iliescu *et al.* A partir dos cálculos DFT foi possível estudar o sítio de adsorção da benzilpenicilina sobre AgNP. Os autores mostraram que a interação ocorria através do carboxilato, e que os anéis benzeno,  $\beta$ -lactâmico e tiazolidino estavam longe da superfície metálica da prata (ILIESCU; BAIA; PAVEL, 2006).

Dendrímeros de prata nanoestruturados possibilitaram a obtenção dos espectros SERS dos antibióticos enrofloxacino, ciprofloxacino e cloramfenicol utilizando radiação excitante de comprimento de onda em 785 nm. O fator de intensificação SERS analítico calculado foi de  $10^4$  e o limite de detecção e quantificação alcançou o nível de 20 ppb (HE, L. L. et al., 2010).

A síntese de nanopartículas de prata recobertas com QUIT com formato triangular foi reportada por Potara *et al.* Foi demonstrado uma excelente estabilidade da suspensão, o que permitiu a utilização destas nanopartículas como sensor plasmônico para a detecção do p-aminotiofenol. Foram obtidos ainda, os espectros SERS do p-aminotiofenol nas concentrações de  $10^{-7}$ - $10^{-9}$  mol.L<sup>-1</sup> e da adenina que é

uma das bases nitrogenadas que formam o DNA (POTARA; GABUDEAN; ASTILEAN, 2011).

A síntese de nanopartículas de prata sintetizada por Potara *et al.*, e acima citada foi modificada por p-aminotiofenol que é uma molécula SERS marcadora e ácido fólico. A modificação com ácido fólico permitiu que estas nanopartículas fossem reconhecidas pela célula de câncer de ovário humano através dos receptores folato presente em tais células. A confirmação da modificação da superfície das AgNP e o reconhecimento através dos receptores folato pelas células câncer foi realizado através das espectroscopias LSPR e SERS, monitorando-se os sinais SERS da molécula SERS marcadora (BOCA-FARCAU *et al.*, 2014).

O espectro SERS do fármaco parientin adsorvido sobre AgNP foi reportado por Fabriciova *et al.* O fármaco parientin foi escolhido por apresentar ação antibacteriana e antifúngica conhecida, e também por induzir e inibir a proliferação celular de várias células de câncer humano. Os autores demonstraram que o sítio de interação do parientin sobre a superfície metálica da prata é através das hidroxilas e da carbonila da cadeia lateral. Obteve-se ainda, a isoterma de adsorção com um alto valor da constante de adsorção, o que indica uma alta afinidade de tal fármaco pela superfície metálica da prata (FABRICIOVA *et al.*, 2012).

O espectro SERS do antibiótico cloranfenicol adsorvido sobre AuNP e a atribuição vibracional baseado em cálculos DFT foi reportado por Ji e Yao. A partir da variação da concentração do antibiótico foi possível plotar a variação da intensidade Raman da banda em  $1344\text{ cm}^{-1}$  em função da concentração obtendo-se uma correlação linear, e um limite de detecção de  $0,1\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  para tal fármaco. Com tal curva analítica, foi possível quantificar a quantidade de cloranfenicol presente em amostras de comida (JI; YAO, 2015).

O espectro SERS do antibiótico levofloxacina adsorvido sobre AgNP foi reportado por Hidi *et al.* A partir da análise dos espectros SERS os autores demonstraram que o sítio de interação da levofloxacina nas AgNP é através do grupo carboxilato, adotando uma conformação em ângulo em relação a superfície metálica. Os autores demonstraram ainda, uma correlação linear quando foi plotado a intensidade da banda SERS em  $1395\text{ cm}^{-1}$  variando-se a concentração de  $1\text{-}15\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ , permitindo calcular o limite de detecção da levofloxacina que foi de  $0,8\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  (HIDI *et al.*, 2015).

A síntese de nanopartículas de ouro modificadas com polietileno glicol tiolado (tiol-PEG) foi reportada por Qian *et al.* A conjugação destas nanopartículas com o anticorpo ScFv permitiu que estas fossem alvos para tumores através do reconhecimento do receptor de crescimento epidermal que é expressado por muitos tipos de tumores humanos malignos. A modificação das nanopartículas com marcador Raman permitiu verificar a acumulação das nanopartículas no tecido tumoral através do monitoramento dos espectros SERS da molécula Raman marcadora (QIAN *et al.*, 2008).

A síntese de vesículas construídas utilizando nanopartículas de ouro e os biopolímeros polimetilmetacrilato (PMMA) e polietileno glicol (PEG) com a finalidade de carrear o fármaco doxorrubicina para células alvo de câncer foi reportada por Song *et al.* Os autores utilizaram a técnica de espectroscopia SERS para verificar se a vesícula foi entregue ou não a célula alvo, e se ocorreu ou não a endocitose da mesma pela célula alvo. Quando a vesícula estava no exterior da célula, esta apresentava intensificação dos sinais Raman do marcador SERS, atribuída a ressonância da vesícula plasmônica e a radiação excitante de comprimento de onda em 633 nm utilizada nos experimentos SERS. Quando a vesícula estava no interior da célula, a vesícula era desfeita devido a uma mudança no pH na parte interior da célula, ou seja uma mudança de ambiente hidrofóbico para ambiente hidrofílico, o que ocasionava a liberação do fármaco doxorrubicina preso na vesícula e conseqüentemente uma diminuição da intensificação SERS da molécula marcadora (SONG; ZHOU; DUAN, 2012).

O estudo dos mecanismos de sinergia observados na ação antibacteriana utilizando a espectroscopia SERS foi reportado por Deng *et al.* Os autores observaram sinergia para os antibióticos enoxacina, kanamicina, neomicina e TC, enquanto que para os antibióticos ampicilina e penicilina não foi observado sinergia na ação antibacteriana frente à bactéria *Salmonella typhimurium*. A análise dos espectros SERS e UV-VIS mostrou que para os quatro antibióticos que interagiram de forma sinérgica houve a formação do complexo de superfície, enquanto que para a ampicilina e penicilina que não apresentavam sinergia na ação, não houve a formação do complexo de superfície (DENG *et al.*, 2016).

Nanoestrelas de ouro recobertas com o fármaco mitoxantrona, foram utilizadas para o tratamento e diagnóstico (teragnosis) de câncer de pulmão em camundongos. Através da técnica SERS foi possível observar a intensificação dos sinais Raman do

fármaco mitoxantrona que estavam localizados no interior do tecido tumoral, uma vez que ocorria formação de “*hot spots*” no interior da célula do tumor. O mapeamento SERS deste fármaco permitiu observar que após 5 minutos de injeção as nanoestrelas estavam acumuladas no coração sendo isto devido a organização vascular deste tecido, e após 4 h de administração deste fármaco, estas foram direcionadas para o tecido tumoral. Os autores confirmaram a existência do sinal SERS *in vivo*, o acúmulo das nanoestrelas recobertas com mitoxantrona no tecido tumoral e a especificidade das nanoestrelas recobertas com mitoxantrona (TIAN et al., 2016).

Diante da vasta literatura, importância e vantagens apresentada pela espectroscopia SERS como ferramenta emergente na compreensão dos sítios de interação de biomoléculas adsorvidas sobre nanoestruturas metálicas de prata, ouro e cobre, neste trabalho são apresentados o uso de AgNPs e AuNPs para a compreensão da adsorção dos antibióticos tinidazol, metronidazol, aztreonam, rifampicina e TC sobre essas nanopartículas.

## 1.8. MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES METÁLICAS POR MOLÉCULAS ORGÂNICAS E INORGÂNICAS

A modificação da superfície de AgNP e de AuNP permitem que estas sejam utilizadas em diversas áreas tais como na construção de biossensores, sistemas de entrega controlada de fármacos e controle das propriedades físico-químicas desses biodispositivos (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002; STELZLE; WEISSMULLER; SACKMANN, 1993; XU et al., 2014). Esta modificação muitas vezes é realizada pela modificação da superfície por mercaptanas e íons cloreto.

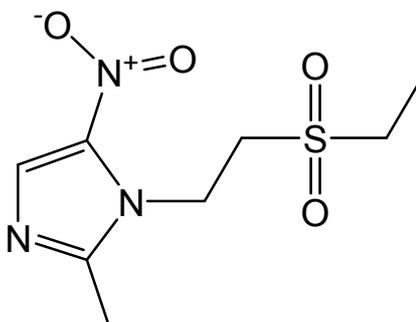
A modificação das nanopartículas metálicas por mercaptanas permite que estas adquiram boa estabilidade, obtenção de espectros SERS de forma controlada e um excelente controle da hidrofobicidade das superfícies metálicas. De forma particular, a modificação da superfície metálica de prata por 2-mercaptoetanol permitiu monitorar a adsorção de ciclohexanol e do ácido benzóico através da espectroscopia SERS (HONG; LI, 2013). Esta modificação permitiu ainda a imobilização e o controle da adsorção de  $\beta$ -caroteno sobre AgNP (TARABARA; NABIEV; FEOFANOV, 1998). Além desses, muitos outros trabalhos são direcionados em investigar a adsorção das mercaptanas, os quais tentam compreender algumas questões básicas que envolvem quimissorção ou fisissorção, cisão ou não da ligação SH e o sítio de adsorção e orientação dessas sobre as superfícies metálicas (FONSECA, 2016).

Além da modificação por mercaptanas destaca-se ainda a modificação das AgNP e AuNP por íons inorgânicos, em particular íons cloreto. Estes são altamente utilizados em experimentos SERS para promover a formação de agregados de AgNP, permitindo assim a formação de “*hot spots*”(PERGOLESE; MUNIZ-MIRANDA; BIGOTTO, 2005). Os íons cloreto, muitas vezes permitem a formação de par iônico, o qual facilita a adsorção da molécula de interesse sobre a superfície metálica (HOWES et al., 2007). Devido ao crescente apelo para a modificação das superfícies metálicas de ouro e prata de forma a se controlar a adsorção de biomoléculas, neste trabalho foram utilizados os modificadores superficiais 2-mercaptoetanol e íons cloreto para se obter os espectros SERS do tinidazol, metronidazol, aztreonam e rifampicina.

### 1.9. TINIDAZOL (TI)

O TI, 1-[2-(etilsulfonil)etil]-2-metil-5-nitroimidazol, pertence à classe dos nitroimidazóis, e apresenta atividade amebicida, giardicida, tricomonocida e em infecções causadas por bactérias anaeróbicas. A estrutura molecular do TI está representada na Figura 5.

Figura 5: Estrutura molecular do TI



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O mecanismo de ação do TI está associado à facilidade deste atravessar a membrana celular de microorganismos aeróbios, anaeróbios e protozoários. Além disso, a ativação do grupo nitro através da formação de espécies radiculares é essencial para a atividade biológica. Os radicais livres e os intermediários formados no processo de redução deste composto induzem a liberação da fosfato timidina, que promove a

desestabilização e ruptura da dupla hélice de DNA e sua subsequente degradação (VOOGD; VANDERSTEL; JACOBS, 1977).

O espectro FTIR e FT-Raman do TI foi reportado por Gunazekaram *et al.*. Através dessas técnicas espectroscópicas os autores conseguiram estudar a estabilidade deste fármaco sobre diferentes condições de armazenagem e interações com outros elementos. A atribuição vibracional foi feita pela comparação com outras estruturas semelhantes disponíveis na literatura (GUNASEKARAM; ANITTA, 2009).

O espectro SERS do TI não foi publicado na literatura. No entanto, vários trabalhos discutem a atribuição vibracional do anel imidazólico presente na estrutura do TI.

Carter e Pemberton obtiveram o espectro SERS do imidazol em pH 9 e pH 2 adsorvido em eletrodo de prata junto com a comparação com o espectro Raman normal. Os autores relataram que as mudanças acontecidas no espectro SERS quando comparadas com o espectro Raman normal foram devidas a adsorção do imidazol que ocorria através do nitrogênio 3 do imidazol. Foi demonstrado ainda, a influência do potencial na adsorção, onde para potenciais mais positivos o anel se posicionava em ângulo, enquanto que para potenciais mais negativos o anel ficava perpendicular em relação a superfície metálica da prata (CARTER; PEMBERTON, 1992)

O espectro SERS do imidazol também foi reportado por outros autores (XUE; DAI; JIANG, 1988), (LOO *et al.*, 2006), (BISWAS *et al.*, 2009). Todos estes trabalhos relataram a adsorção do imidazol através do nitrogênio 3, com modificações da orientação devidas ao potencial aplicado e modificações do pH do meio.

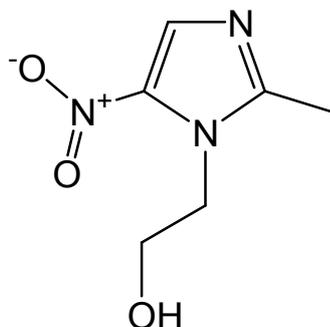
#### 1.10. METRONIDAZOL (MT)

O MT [1-(2-hidroxil) 2 metil 5 nitroimidazol] também é um nitroimidazol e apresenta ação bactericida principalmente contra a bactéria *Helicobacter pylori* (GRAHAM *et al.*, 1992). Da mesma forma como no TI, a ação bactericida do MT depende da ativação do grupo nitro (PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009). Este apresenta os mesmos radicais gerados na redução dos dois fármacos, e por serem derivados do 5-nitroimidazol possuem potenciais eletrônicos e ação antibacteriana similares (PAULA *et al.*, 2009). O MT age através da ligação de produtos intermediários, originados de sua redução intracelular com o DNA, formando complexos que inibem a replicação e inativam o DNA, impedindo desta forma as sínteses enzimáticas e causando a morte celular. Sua ação seletiva é devida à presença

da atividade de um sistema de baixo potencial de oxirredução, como a ferredoxina, que reduz o grupo nitro do MT gerando produtos intermediários que têm ação tóxica e são responsáveis pela ação antibacteriana (MIYACHI, 2001).

A estrutura molecular do MT está representada na Figura 6.

Figura 6: Estrutura molecular do MT



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O espectro SERS do MT adsorvido sobre nanobastões de prata foi reportado por Han *et al.*. Foi realizado a detecção SERS deste fármaco em amostras padrão e em amostras reais de solo, água, lago e pântano. O limite de detecção para as amostras padrão foi de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e para as amostras reais o limite de detecção variou de 10-50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (HAN, C. Q. et al., 2014).

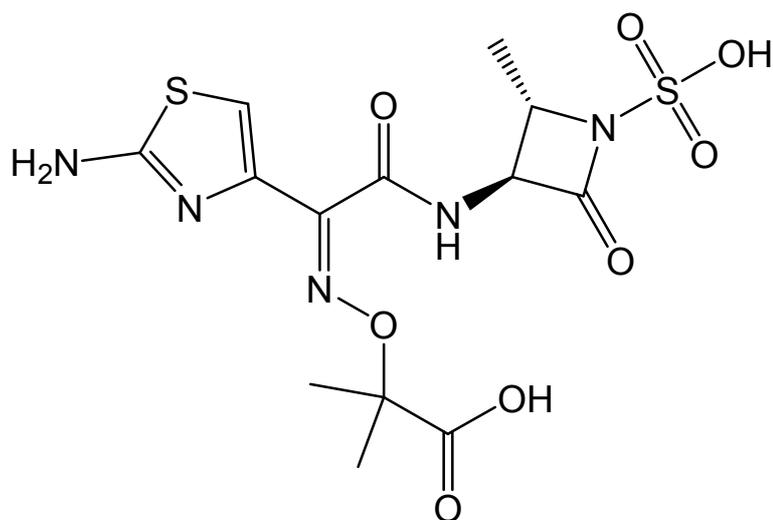
#### 1.11. AZTREONAM (AZ)

AZ ácido [2S-[2 $\alpha$ ,3 $\beta$ (Z)]]-2-[[[1-(2-amino-4-tiazolil)-2-[2-metil-4-oxo-1-sulfo-3-azetidil)amino]-2-oxoetildieno]amino]oxil]-2-metilpropanóico é um antibiótico sintético, pertencente à classe dos monobactâmicos, e possui atividade contra uma grande variedade de bactérias Gram-negativas, mas pouco afinidade contra anaeróbios ou aeróbios Gram-positivos (PLOSKER, 2010).

O mecanismo de ação desse antibiótico é devido a grande afinidade de ligação com proteínas fixadoras de penicilina, ocasionando o efeito bactericida.

O AZ é bastante resistente as  $\beta$ -lactamases que são sintetizadas por diferentes espécies Gram-negativas (PATERSON; BONOMO, 2005). A estrutura molecular do AZ está representada na Figura 7.

Figura 7: Estrutura molecular do AZ



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

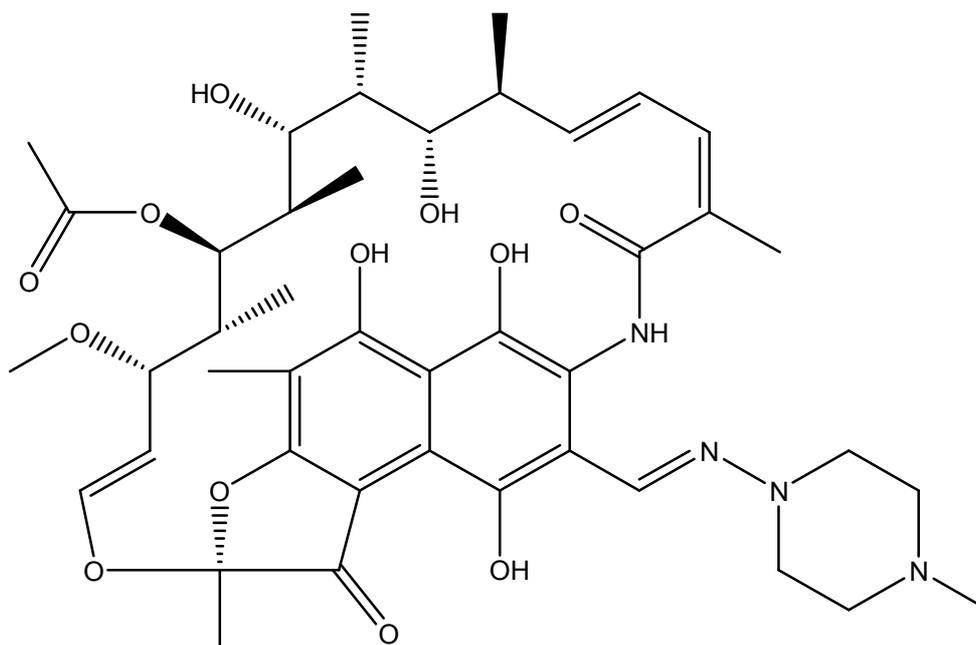
Não há relatos na literatura sobre o espectro Raman e/ou SERS desta molécula.

#### 1.12. RIFAMPICINA (RP)

A RP é um antibiótico derivado semi-sintético da rifamicina, utilizada principalmente no tratamento da tuberculose. O tratamento da tuberculose é longo, e além da RP utiliza-se concomitantemente a isoniazida, a pirazinamida e o etambutol. Também tem sido reportado o uso deste fármaco no tratamento da brucelose em humanos, icterícia e prurido.

Seu mecanismo de ação é através da inibição da RNA-polimerase dependente de DNA de micobactérias e de outros microorganismos, através da formação de um complexo fármaco-enzima estável, resultando em supressão do início da formação da cadeia na síntese de RNA. A estrutura molecular da RP está representada na Figura 8.

Figura 8: Estrutura molecular da RP



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Os espectros Raman e SERS da RP adsorvida sobre AgNP foram reportados por Howes *et al.* A atribuição vibracional foi realizada por comparação com outras estruturas presentes na literatura (HOWES *et al.*, 2006).

A influência do pH e os mecanismos de adsorção da RP adsorvida em AgNP também foi reportado por Howes *et al.* Os autores mostraram uma forte dependência do espectro SERS com o pH, as propriedades do adsorbato e a presença de ânions (em particular íons cloreto). A presença dos íons cloreto permitiu a formação de um par iônico entre o cloreto e o nitrogênio quaternário protonado quando o pH era próximo de 6 (HOWES *et al.*, 2007).

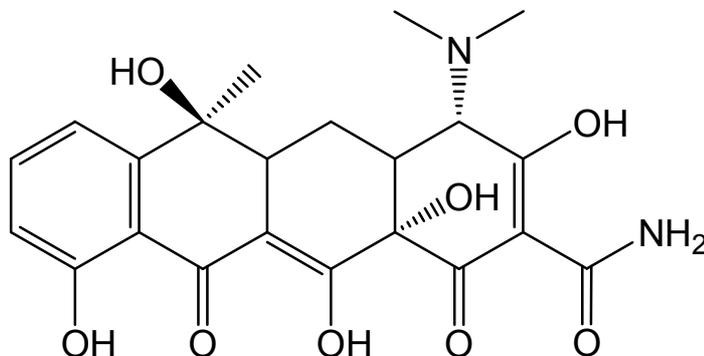
### 1.13. TETRACICLINA (TC)

A TC é um antibiótico de largo espectro de ação e baixo custo, e atua contra bactérias *Gram positivas* e *Gram negativas* Clamídias, Riquetsias e até sobre alguns protozoários. Por estas razões a TC é amplamente utilizada em medicina veterinária para prevenir e tratar diversas doenças bem como promover o crescimento de rebanhos (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

O mecanismo de ação da TC é através da inibição da síntese protéica, onde o fármaco se liga preferencialmente às subunidades ribossomais 30 S dos microorganismos, impedindo que os RNA transportadores (RNAt) se fixem aos ribossomas. Desta forma, não ocorre a incorporação dos aminoácidos na cadeia

polipeptídica (FROST, 1969). A estrutura molecular da TC está representada na Figura 9.

Figura 9: Estrutura molecular da TC



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O espectro Raman e Infravermelho da TC e de alguns derivados da TC foi reportado por Leybold *et al.*. Os autores obtiveram os espectros Raman da molécula no estado sólido e em solução variando-se o pH e o solvente utilizado. A atribuição vibracional foi baseada em cálculos DFT, onde se demonstrou uma excelente correlação entre os dados experimentais e os teóricos (LEYPOLD *et al.*, 2003).

O espectro SERS da TC foi reportado por vários autores (JIN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2016). Em nosso trabalho prévio, foram demonstrados os espectros SERS dos antibióticos TC, benzilpenicilina e levofloxacin utilizando radiação excitante em 1064 nm. Através de cálculos DFT foi possível inferir o sítio de interação em relação a superfície metálica da prata (FILGUEIRAS, A. L. *et al.*, 2015). Em outro trabalho, foi demonstrado que a combinação de AgNP e o antibiótico TC promovia um efeito de sinergia na ação antibacteriana (FILGUEIRAS, A.L. *et al.*, 2017, submetido). Além disso, a TC é muito utilizada na medicina veterinária, devido ao seu amplo espectro de ação e seu baixo custo.

Devido ao fato do antibiótico TC ser muito utilizado na medicina animal e apresentar um efeito de sinergia quando combinado com AgNP, escolhemos este antibiótico para avaliarmos a citotoxicidade das AgNP combinadas com QUIT e TC frente células de fibroblastos bovinos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Estudar a adsorção dos antibióticos TI, MT, AZ, TC e RP em superfícies de AgNP ou AuNP, por espectroscopias SERS e UV-VIS.

Realizar estudos *in vitro* da citotoxicidade de AgNPs em células de fibroblastos bovinos e da mistura AgNP-QUIT-antibiótico com bactérias.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estes foram divididos em 3 classes A, B e C, a partir de 3 tipos de nanopartículas metálicas sintetizadas.

A.1. Sínteses de AgNPs em suspensões aquosas, com controle sobre a dispersão de tamanhos, para a obtenção de AgNPs com transições LSPR em ressonância com as radiações excitantes em 532 ou 633 nm;

A.2. Obtenção dos espectros SERS dos antibióticos TI, MT, AZ, RP e TC utilizando AgNPs, e as radiações excitantes de comprimento de onda 532 ou 633 nm;

A.3. Obtenção dos espectros SERS dos antimicrobianos adsorvidos em suspensões de AgNP quimicamente modificadas por mercaptoetanol, polivinil álcool e íons cloreto;

A.4. Obtenção dos espectros UV-VIS das suspensões de AgNPs na presença destes antibióticos;

A.5. Obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) das nanopartículas em suspensões aquosas;

B.1. Sínteses de AgNPs anisotrópicas, recobertas com QUIT e TC com controle sobre a dispersão de tamanhos para maximizar a ação antibacteriana;

B.2. Obtenção das imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de bactérias *Gram positivas* e *Gram negativas* na ausência e na presença das AgNPs;

B.3. Estudo do efeito de toxicidade de AgNPs frente a células de fibroblastos bovinos;

C.1. Síntese de AuNP em suspensões aquosas, com controle sobre a dispersão de tamanhos, para a obtenção dos espectros UV-VIS e SERS da RP

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), citrato de sódio, nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), QUIT, polivinilálcool (PVA), ácido acético, TI, MT, TC e AZ foram obtidos da Sigma Aldrich. A água utilizada no preparo das soluções foi água deionizada Milli-Q, 18,2M $\Omega$ cm. Toda a vidraria foi limpa em solução de água régia (3:1;  $\text{HCl}:\text{HNO}_3$ ) e enxaguada abundantemente com água deionizada.

#### 3.2. SÍNTESE DAS AGNP ANISOTRÓPICAS

Neste trabalho diferentes rotas de sínteses foram utilizadas com a finalidade de se obter AgNP que tenham transições LSPR em ressonância com as radiações excitantes em 532 e 633 nm utilizadas nos experimentos SERS (método A1, A2 e C) e pequenas o suficiente para maximizar o efeito antibacteriano (método B).

##### 3.2.1. Método A1: coloides A1.1, A1.2, A1.3, A1.4 e A1.5

Os coloides preparados de acordo com o método A1, foram obtidos de acordo com a modificação da síntese original do artigo descrito por Creighton *et al.* (CREIGHTON, J. ALAN; BLATCHFORD, CHRISTOPHER G.; ALBRECHT, M. GRANT, 1979). Para tanto, em 60,0 mL de uma solução de  $\text{NaBH}_4$   $1,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  foi adicionado gota a gota 20,0 mL de uma solução de  $\text{AgNO}_3$   $16,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . A mistura foi deixada em banho de gelo. Para a estabilização e melhor cobertura das AgNPs ao final da síntese foi adicionado 0,6 mL de citrato de sódio 1%. Cinco coloides distintos foram obtidos mantendo-se a concentração dos reagentes precursores, no qual dois coloides foram preparados utilizando-se micropipeta, dois coloides foram preparados utilizando bomba de seringa com taxa de injeção fixa de 0,5 mL / min, e um coloide foi preparado utilizando bomba de seringa com taxa fixa de 3,0 mL / min.

##### 3.2.2. Método A2

Para a síntese preparada de acordo com o método A2 foram realizadas 3 etapas de crescimento, constituídas nas seguintes sínteses:

Síntese das partículas precursoras (“seed” ou nucleadoras):coloide A2.1

Esta síntese foi realizada de acordo com metodologia proposta inicialmente por Power *et al.* (POWER; BETTS; CASSIDY, 2011) Para tanto, em 2,00 mL de uma

solução de  $\text{AgNO}_3$   $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  foi adicionada 2,00 mL de uma solução PVA 1% (m/v). Sob agitação constante, foi adicionado gota a gota, 2,00 mL de uma solução de  $\text{NaBH}_4$   $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

1ª Etapa de crescimento: coloide A2.2

Em 21,5 mL de  $\text{AgNO}_3$   $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  foi pipetado 1,00 mL do coloide A2.1 e 3,00 mL de uma solução de citrato de sódio 1 % e mantida sob agitação constante durante 1 min. Após isso, foi adicionado 1,00 mL de uma solução de  $\text{NaBH}_4$   $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  utilizando-se bomba de seringa com taxa de injeção  $33,33 \mu\text{L}/\text{min}$ , seguida da adição de 5,00 mL de uma solução de  $\text{NaBH}_4$   $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  utilizando-se bomba de seringa e taxa de injeção de  $66,66 \mu\text{L}/\text{min}$ .

2ª Etapa de crescimento: coloide A2.3

Em 21,5 mL de  $\text{AgNO}_3$   $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  foi pipetado 2,68 mL do coloide A2.2, de forma que fosse mantido a mesma quantidade de núcleos de Ag, e 3,00 mL de uma solução de citrato de sódio 1 % e mantida sob agitação constante durante 1 min. Após isso, foi adicionado 1,00 mL de uma solução de  $\text{NaBH}_4$   $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  utilizando-se bomba de seringa com taxa de injeção  $33,33 \mu\text{L}/\text{min}$ , seguida da adição de 1,00 mL de uma solução de  $\text{NaBH}_4$   $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  utilizando-se bomba de seringa e taxa de injeção de  $33,33 \mu\text{L}/\text{min}$  e outros 4,00 mL dessa solução com taxa de injeção  $66,66 \mu\text{L}/\text{min}$ .

### 3.2.3. Método B: coloides B1, B2, B3 e B4

A síntese preparada de acordo com o método B foi previamente descrita em nosso trabalho (FILGUEIRAS A.L., 2013). Para tanto, em 50,0mL de uma solução de  $\text{AgNO}_3$   $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  foi adicionado 1,0 mL de solução de citrato de sódio  $1,6 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  e gotejada à temperatura ambiente 0,5 mL de uma solução de  $\text{NaBH}_4$   $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Após este procedimento, foi adicionado gota a gota 5,00 mL de uma solução de QUIT  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  previamente solubilizada em solução de ácido acético 1% (v/v). O pH dessa síntese foi ajustado para  $\text{pH} = 6,0$ .

### 3.2.4. Método C

Os coloides preparados de acordo com o método C foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por Frens *et al.* (FRENS, 1973) Para tanto, 50,0 mL de uma solução de  $\text{HAuCl}_4$   $2,94 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  foi levada a ebulição em um sistema de refluxo, e posteriormente foi adicionado gota a gota 500 ou 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução de citrato de sódio  $3,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . O indicativo do final da síntese foi quando a coloração do coloide mudou de azul para vermelho.

## 3.3. INSTRUMENTAÇÃO

### Espectroscopia Raman e espectroscopia SERS

As medidas SERS e Raman dos adsorbatos TI, MT, AZ, TC e RP foram feitas utilizando espectrômetro Raman dispersivo da Bruker, modelo Senterra, com radiação excitante em 532, 633 e 785 nm e detector CCD (*charge-coupled device*).

Os espectros SERS foram obtidos misturando-se 100  $\mu\text{L}$  do coloide (A1 ou A2) com 100  $\mu\text{L}$  de solução dos adsorbatos estudados na concentração  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  para o TI, MT e AZ e  $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  para o antibiótico TC, obtendo a concentração final de  $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  para o TI, MT e AZ e  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  para a TC. Os espectros SERS do TI, MT e AZ foram obtidos na presença dos modificadores de superfície 2-mercaptoetanol, PVA e ácido clorídrico (HCl). A concentração final de 2-mercaptoetanol foi  $1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ , a de PVA 1% (m/v) e HCl foi  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Os espectros Raman do TI, MT e AZ isolados foram obtidos utilizando-se radiação excitante de comprimento de onda em 633 nm, 2mW de potência do laser e 5 acumulações de 50 segundos cada. Os espectros SERS desses adsorbatos foram obtidos utilizando-se radiação excitante de comprimento de onda em 633 nm, 2 mW de potência do laser e 3 acumulações de 30 segundos cada, com exceção para o TI no qual foram obtidos os espectros SERS com potência de 2, 5 e 20 mW. O espectro SERS da TC foi obtido utilizando-se radiação excitante de comprimento de onda em 532 nm, 0,2 mW de potência do laser e 3 acumulações de 30 segundos cada.

Os espectros Raman e SERS da RP adsorvida sobre AuNP (método C) foram obtidos utilizando espectrômetro FT-Raman da Bruker, modelo RFS-100, equipado com detector de germânio, resfriado com nitrogênio líquido e linha de excitação em 1064 nm. O espectro Raman da RP isolada foi obtido utilizando-se 35 mW de potência do laser e 500 scans. Os espectros SERS foram obtidos utilizando-se 200 mW de potência do laser e 500 scans.

Os espectros Raman e SERS da RP adsorvida sobre AgNP (método A1) foram obtidos utilizando espectrômetro Raman dispersivo da Bruker, modelo Senterra, com radiação excitante em 532 e 633 nm e detector CCD. O espectro Raman ressonante da solução de RP na concentração  $2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi obtido utilizando-se radiação excitante de comprimento de onda em 532 nm, 2mW de potência do laser e 3 acumulações de 30 segundos. O espectro Raman pré ressonante da RP foi obtido utilizando-se radiação excitante de comprimento de onda em 633 nm, 2mW de potência do laser e 3 acumulações de 30 segundos. Os espectros SERS da RP foram obtidos utilizando-se linhas lasers de comprimento de onda em 532 e 633 nm, 2 mW de potência do laser e 2 acumulações de 30 segundos.

Os espectros SERS da RP adsorvida sobre as AgNP e AuNP foram obtidos utilizando-se as concentrações finais de RP numa faixa de  $1,0\text{-}2,2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . A concentração final de 2-mercaptoetanol utilizada variou de  $0,5\text{-}2,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ , e a concentração final de KCl utilizada foi de  $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Na Figura 54 o espectro SERS da RP na presença de ME adsorvida em AuNP foi obtido pela mestranda Dhieniffer Ferreira de Carvalho e na Figura 55 o espectro SERS da RP adsorvida em AuNP foi obtido pela aluna Marcela Arantes Meirelles.

### **Espectroscopia UV-VIS**

Os espectros UV-VIS das AgNP e dos adsorbatos TI, MT, AZ e RP foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-PC 1800, com lâmpada de tungstênio (infravermelho próximo e visível) e de deutério (ultravioleta), utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm e 0,5 cm. Todos os espectros foram obtidos após diluição do coloide em H<sub>2</sub>O utilizando a proporção 1:10.

A concentração final dos adsorbatos estudados foi de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  e a concentração final de 2-mercaptoetanol foi de  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Para os espectros UV-VIS das AgNP na presença dos adsorbatos TI, MT e AZ foi utilizado cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm. Entre os diferentes espectros foi realizada a lavagem da cubeta com solução de água régia, uma vez que a suspensão de AgNP impregnava-se sobre o quartzo.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram obtidas utilizando-se microscópio eletrônico de varredura, Field Emission Gun, da FEI, modelo: Magellan operando em 15kV. Este aparelho pertence à Divisão de Metrologia

de Materiais, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). As amostras foram preparadas gotejando a suspensão coloidal sobre silício e secando utilizando-se bomba de secagem a vácuo.

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das bactérias tratadas ou não com as AgNPs foram obtidas em um instrumento FEI Tecnai Spirit 12 operando em 80 kV. Este aparelho pertence à Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida, Instituto Nacional de metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). As amostras de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* tratadas e não tratadas com suspensão AgNPs, foram preparadas em PBS, fixadas em solução 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído com pH ajustado para 7,2, e pós fixadas em solução 1% de tetróxido de ósmio, 0,8 % ferrocianeto de potássio,  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de cloreto de cálcio, com pH ajustado para 7,2. Após este procedimento as bactérias foram incorporadas em uma resina Epon e seções ultrafinas foram obtidas com acetato de uranil.

### **3.4. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ E POTENCIAL ZETA**

As medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta foram realizadas na Embrapa Gado de Leite no laboratório do pesquisador Humberto Brandão utilizando o instrumento Malvern modelo DLS Zeta sizer Nano ZS.

### **3.5. CENTRIFUGAÇÃO DAS AGNP+QUIT**

A centrifugação das AgNP na presença de QUIT foi realizada na Embrapa Gado de Leite utilizando ultra centrífuga modelo Sorvall RC5B, velocidade de rotação de 19 000 e 21 000 rpm por 30 minutos e força G 4043 e 4939, respectivamente.

### **3.6. CÁLCULOS TEÓRICOS DOS ANTIBIÓTICOS**

Os cálculos das frequências vibracionais dos antibióticos foram executados em parceria com o Prof. Dr Diego Paschoal da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para a simulação dos espectros vibracionais dos antibióticos as geometrias foram otimizadas em fase gasosa no nível DFT com o funcional PBE1PBE e com o conjunto de funções de base 6-31+G(2d) (STEPHENS et al., 1994) para todos os átomos, exceto para os átomos de prata no qual foi utilizado o potencial LANL2DZ (HAY; WADT, 1985). Os espectros Raman foram calculados no mesmo nível de teoria e as frequências e atividades foram usadas como entrada para ajustar a função Lorentziana

de forma a se representar as bandas do espectro. As principais bandas foram atribuídas por meio de análise visual dos modos normais. Todos os cálculos foram realizados usando o programa Gaussian (FRISCH et al, 2009).

### 3.7. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DAS AGNPS FRENTE AS CÉLULAS DE FIBROBLASTOS BOVINOS

Os ensaios de citotoxicidade das AgNPs, das AgNPs combinadas com QUIT (AgNP+QUIT), da tetraciclina (TC) e das AgNPs combinadas com QUIT e tetraciclina (AgNP+QUIT+TC) foram realizados no laboratório de Genética e Biotecnologia do Departamento de Biologia (UFJF) sob supervisão da Profa. Michele Munk.

Para a avaliação do potencial citotóxico das AgNPs frente as células de fibroblastos bovinos foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT brometo de 3, (-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium o qual se baseia na interação do sal tetrazolium com mitocôndrias ativas, produzindo o composto formazam. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi baseada na norma ISO 10993-5 (2009) e em trabalhos anteriores (PEREIRA et al. 2013).

#### 3.7.1 Dispersão da NPs e drogas

As soluções de NPs e drogas (AgNP+QUIT+TC, AgNP+QUIT, AgNP e TC) foram esterilizadas em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Logo em seguida, preparou-se as soluções de drogas nas concentrações de 80, 40, 20, 2, 0,2 e 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O pH das AgNP+QUIT e da solução de tetraciclina (TC) foi ajustado para 6,0.

#### 3.7.2 Cultura e exposição dos fibroblastos

Inicialmente as células foram semeadas em placas de 96 poços utilizando uma densidade de  $3 \times 10^3$  células/poço em 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), acrescido de 10% de SFB e 1% antibióticos (10.000 units  $\text{ml}^{-1}$  penicilina e 10.000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  estreptomicina). O cultivo foi realizado em estufa incubadora (Thermo Scientific Forma, USA) a 37° C, 5% de  $\text{CO}_2$  em ar atmosférico e 95% de umidade por 24 h. Retirou-se o meio de cultura do dia anterior e foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e as soluções de NPs e drogas de acordo com cada tratamento. As amostras foram incubadas por 24 e 48 h. Foram utilizadas 9 repetições para cada tratamento.

Após os períodos de incubação, foi realizada a verificação da atividade biológica utilizando a técnica colorimétrica de MTT. De acordo com a técnica foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de MTT na concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em 180  $\mu\text{L}$  de meio, com incubação a  $37^\circ\text{C}$ , por 4 h. Após esse período, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol ácido e 1 h depois realizada a leitura da microplaca em espectrofotômetro Thermo Scientific Varioskan Flash com leitura utilizando múltiplos comprimentos de onda em 570, 650 e 690 nm.

### **3.7.3 Avaliação da morfologia celular por microscopia ótica**

O acompanhamento do crescimento e morfologia celular dos fibroblastos dos diferentes grupos experimentais foram feitos por microscopia ótica (Nikon TS100F, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) para avaliar o possível impacto da exposição das células às NPs e drogas.

### **Análise estatística**

Os resultados obtidos dos ensaios de citotoxicidade foram analisados através da análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico BIOESTAT, utilizando-se o teste de Tukey para a comparação das médias.

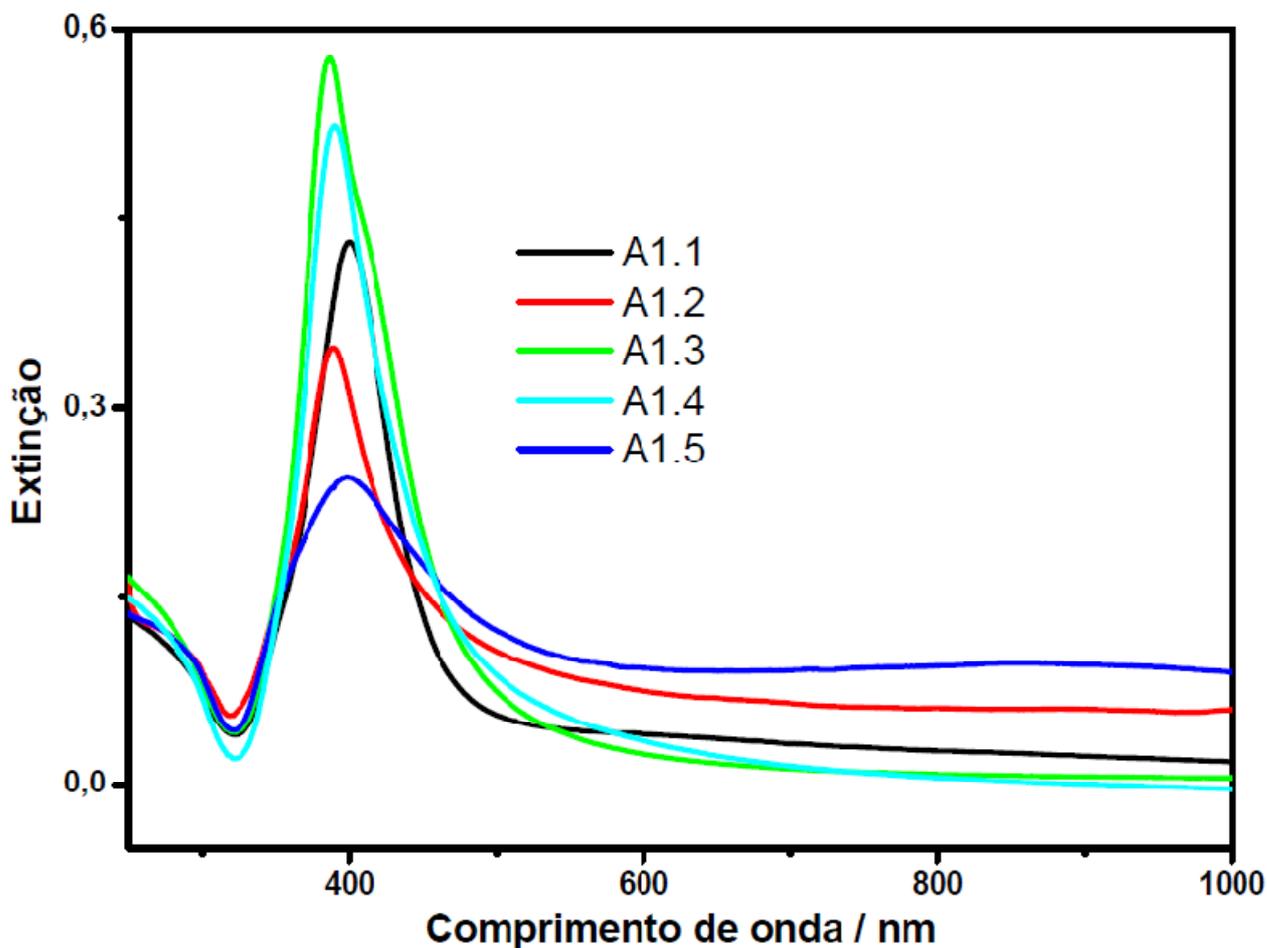
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. ESPECTROS UV-VIS DOS COLOIDES SINTETIZADOS DE ACORDO COM O MÉTODO A1

A Figura 10 mostra os espectros UV-VIS para a síntese do coloide do tipo A1 modificada, obtidos em diferentes condições de síntese. Os espectros A1.1 e A1.2 foram obtidos para sínteses realizadas com micropipeta e os espectros A1.3, A1.4 e A1.5 foram obtidos para sínteses realizadas com bomba de seringa e taxa de injeção fixa. As sínteses A1.1 e A1.2 mostraram máximo de extinção devido a absorção e espalhamento das AgNP em 401 e 389 nm, respectivamente. A síntese A1.1 mostrou, uma distribuição de tamanhos mais estreita que a síntese A1.2, sendo isto devido à heterogeneidade da adição gota a gota com a micropipeta. As sínteses A1.3 e A1.4 se mostraram bem mais reprodutíveis e com distribuição de tamanhos mais estreita que as sínteses A1.1 e A1.2, sendo isto devido à taxa de injeção fixa de 3,0 mL/min. Observa-se que para taxas de adição mais rápidas há predominância de formação de partículas precursoras (nucleadoras) com máximo de extinção em 390 nm e pouca absorção na região do vermelho e do infravermelho próximo do espectro eletromagnético. Já para taxas mais lentas (A1.5; 0,5 mL/min), observa-se a formação de novas partículas precursoras, que podem evoluir para nanopartículas de maiores tamanhos, o que é devido à lenta cinética de reação, que pode ser catalisada pela superfície metálica. Isto provoca o alargamento da banda LSPR para a região do vermelho e do infravermelho próximo do espectro eletromagnético.

Os coloides preparados de acordo com a metodologia A1 são amplamente utilizados em espectroscopia SERS, uma vez que estes possuem AgNPs com uma larga distribuição de tamanhos, com tamanhos que variam 10-100 nm, o que permite que diferentes linhas lasers sejam utilizadas em diferentes experimentos. Além disso, a preparação das AgNPs, utilizando-se o citrato de sódio, ao final da síntese como modificação do método previamente descrito, permite que estas sejam estáveis por 12 meses dentro da geladeira. Isto se deve ao recobrimento do citrato de sódio, que por repulsão de cargas elétricas dos ânions adsorvidos na superfície das AgNPs permite a estabilização das AgNPs em longos prazos.

Figura 10: Espectros UV-VIS das sínteses A1.1 e A1.2 preparadas com micropipeta; A1.3 e A1.4 preparadas com bomba de seringa e taxa de injeção 3,0 mL/min; A1.5 preparada com bomba de seringa e taxa de injeção 0,5 mL/min.



Diluição 1:10 e caminho óptico: 1 mm

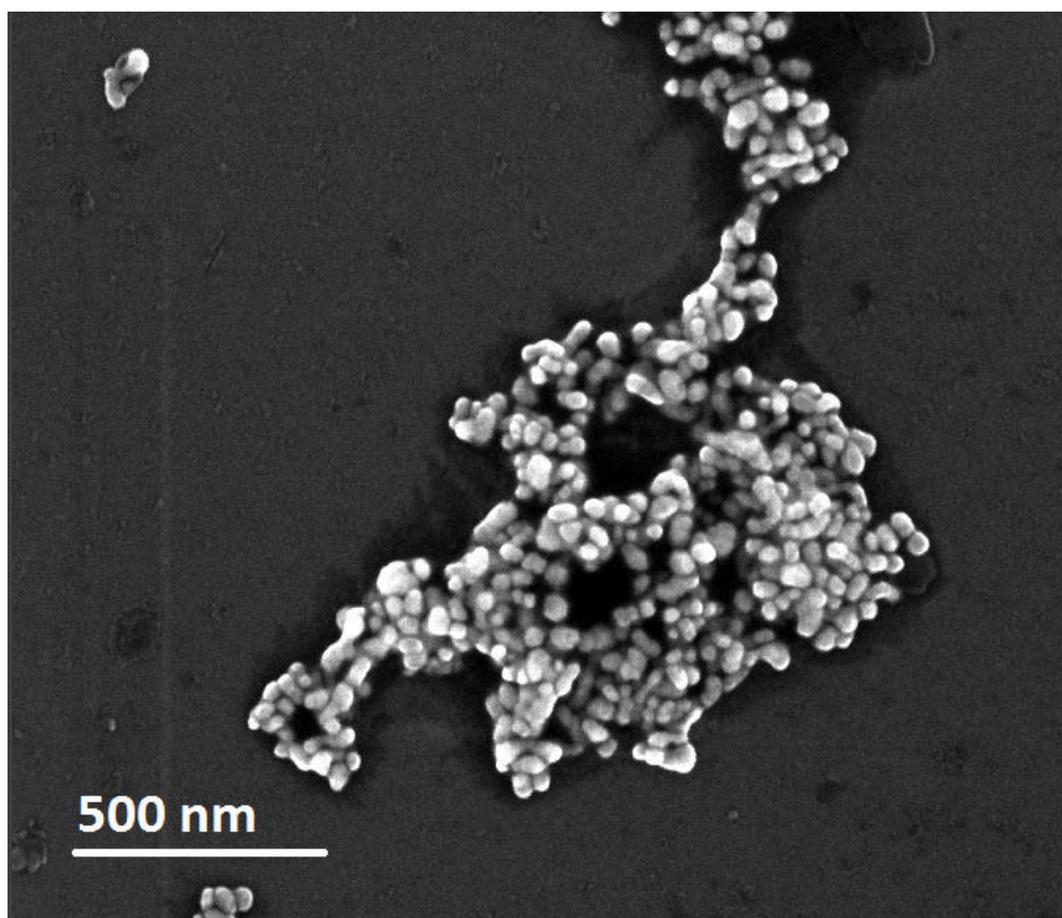
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Os coloides preparados com micropipeta foram os escolhidos para obter os espectros SERS, uma vez que estes apresentaram uma larga distribuição de tamanhos. A presença de agregados de AgNP permitiu a obtenção dos espectros SERS dos antimicrobianos TI, MT e AZ utilizando radiação excitante de comprimento de onda em 633 nm. Os coloides preparados com a bomba de seringa apresentaram contaminação do plástico utilizado para injetar a solução de nitrato de prata, e devido a isto não foram adequados para obter os espectros SERS.

A Figura 11 mostra a imagem SEM para a síntese A1.2. Há a presença de AgNPs com dimensões que variam 30-100 nm. Esta larga distribuição de tamanhos também é observada pela presença de uma banda larga LSPR para este coloide

apresentado na Figura 10. As imagens SEM obtidas reforçam que o controle de injeção é um fator determinante na distribuição de tamanhos das AgNPs, onde observamos que para sínteses preparadas com micropipeta há uma heterogeneidade da adição do sal precursor, o que pode levar a uma larga distribuição de tamanhos.

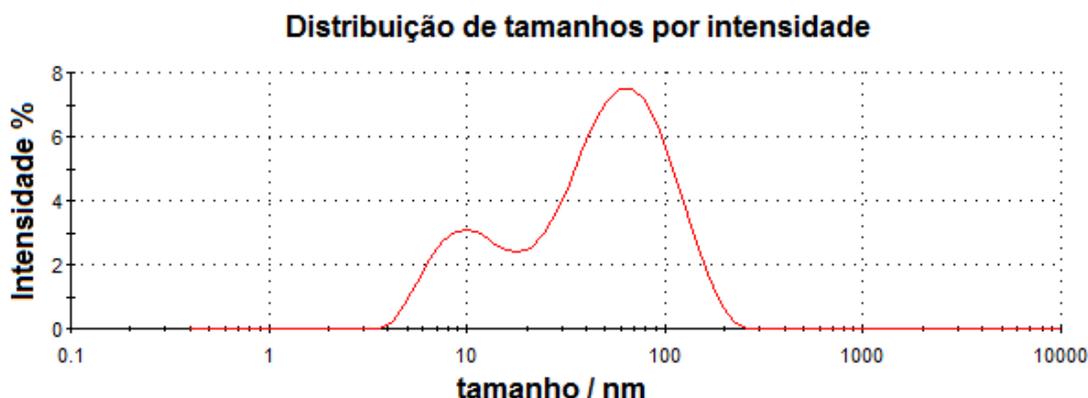
Figura 11: Imagem SEM do coloide A1.2.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica bastante útil que visa a obtenção da distribuição de tamanhos das nanopartículas na suspensão coloidal. A Figura 12 mostra as distribuições de tamanhos para o coloide A1.1 obtidas por medidas de DLS.

Figura 12: Distribuição de tamanhos do coloide A1.1



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Observa-se da Figura 12 que o coloide A1.1 apresenta dois tamanhos médios de nanopartículas, 11 e 70 nm. As partículas de 11 nm são as precursoras enquanto que as 70 nm são devidas a formação dos agregados das nanopartículas precursoras. A medida de potencial Zeta mostrou que as AgNP sintetizadas de acordo com o método A1.1 apresentam uma carga superficial de c.a. -39,5 mV, em pH próximo de 6,0, que é devida a cobertura com a camada de citrato que é o responsável pela estabilização das AgNP.

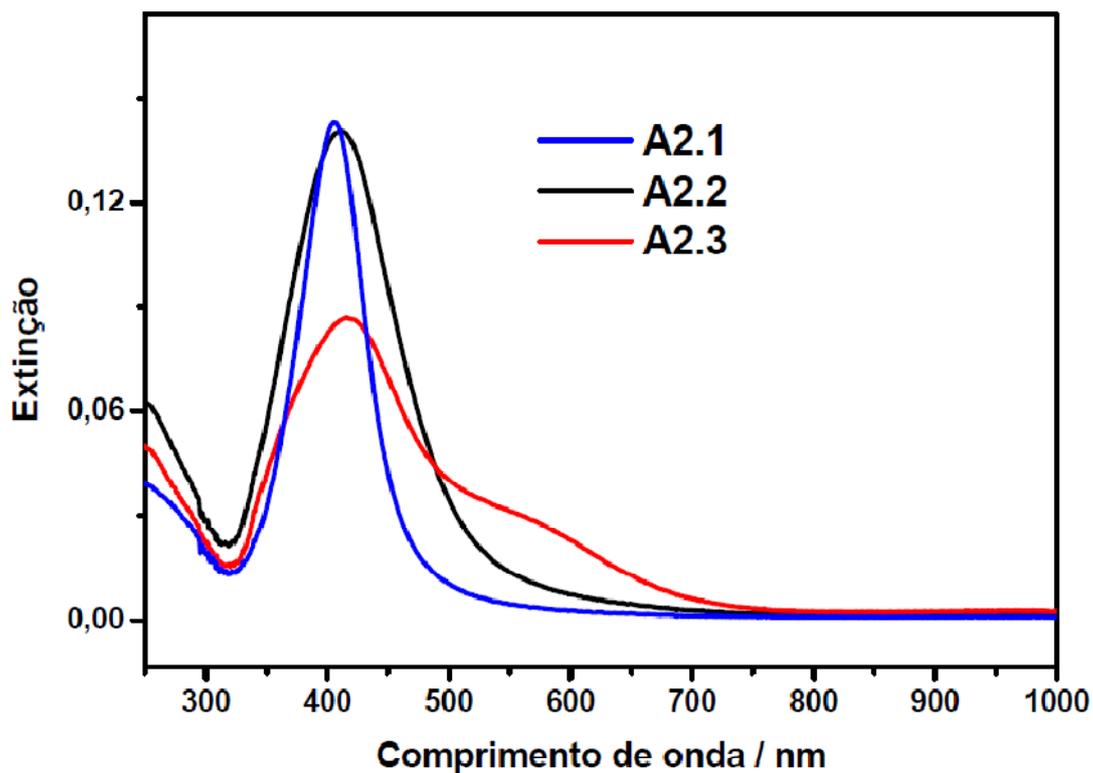
Mikac et al. estudaram a influência do substrato na intensificação do espectro SERS. Foi verificado o potencial Zeta de AgNP sintetizadas na presença de diferentes redutores e distintos valores de pH. Para AgNP sintetizadas na presença do citrato e pH 7,0 o potencial Zeta foi c.a. -33,4 mV, o que esta de acordo com o potencial Zeta obtido em nossos experimentos (MIKAC et al., 2014)

#### 4.2. ESPECTROS UV-VIS DOS COLOIDES SINTETIZADOS DE ACORDO COM O MÉTODO A2

Para obtermos os espectros SERS dos antibióticos pensou-se em uma síntese inédita na qual utilizamos, o polivinil álcool como agente estabilizador. A Figura 13 mostra os espectros UV-VIS do “seed” (A2.1) juntamente com as etapas de crescimento A2.2 e A2.3. Para estas sínteses foi utilizada a bomba de seringa com adição lenta do redutor  $\text{NaBH}_4$ , utilizando-se taxas de 33,33  $\mu\text{L}/\text{min}$  e 66,66  $\mu\text{L}/\text{min}$ , o que permitiu que as AgNPs preparadas por este método evoluíssem para AgNPs de maiores tamanhos. O crescimento da suspensão coloidal não é verificado quando utiliza-se injeção rápida com a micropipeta.

O coloide A2.1 mostra um máximo de extinção centrado em 405 nm característico da formação de partículas pequenas ou precursoras. O coloide A2.2 foi feito utilizando-se 1,00 ml do coloide A2.1, no qual observamos um alargamento da banda LSPR com deslocamento do máximo de extinção para 415 nm. O coloide A2.3 foi feito utilizando-se 2,68 mL do coloide A2.2, no qual observamos um alargamento da banda LSPR deste coloide em relação à do coloide A2.2, com máximo em 420 nm e formação de um ombro em 570 nm estendendo-se para a região do vermelho. Por apresentar extinção na região do vermelho este coloide permite ressonância com a radiação excitante de  $\lambda_0 = 633 \text{ nm}$  e foi escolhido para obtermos os espectros SERS dos adsorbatos estudados neste trabalho.

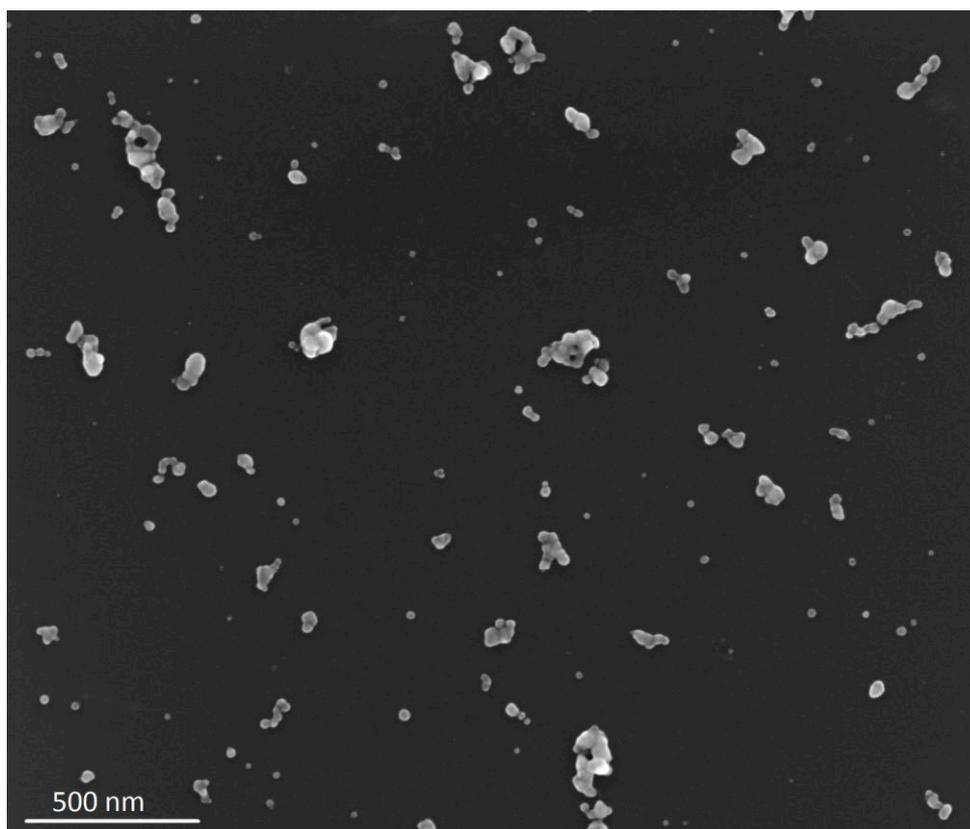
Figura 13: Espectros UV-VIS das sínteses A2.1 “seed”; A2.2 preparado com 1 mL de A2.1; A2.3 preparado com 2,68 mL de A2.2.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 14 mostra a imagem SEM para o coloide A2.3, onde podemos observar uma distribuição de tamanhos de 20-50 nm. As partículas pequenas de 20 nm são responsáveis pelo máximo de extinção em *c.a.* 420 nm e os agregados são responsáveis pelo ombro em *c.a.* 570 nm observado no espectro de extinção.

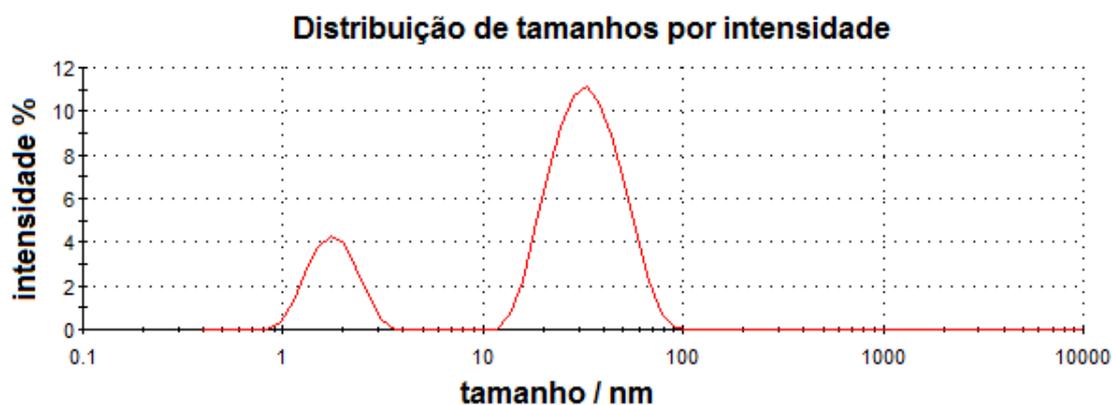
Figura 14: Imagem SEM do coloide A2.3



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 15 mostra as distribuições de tamanhos para o coloide A2.3 obtidas por medidas de DLS.

Figura 15: Distribuição de tamanhos do coloide A2.3



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Observa-se da Figura 15 que o coloide A2.3 apresenta tamanhos médio de nanopartículas em c.a. 35 nm. A medida de potencial Zeta mostrou que as AgNP sintetizadas de acordo com o método A2.3 apresentam uma carga superficial de c.a. -30 mV. O pH das AgNP sintetizadas de acordo com método A2 também é 6,0, logo a

carga superficial negativa é devida a cobertura com a camada de citrato e PVA que são os agentes estabilizadores das AgNP. Quando se compara a carga superficial das AgNP sintetizadas de acordo com o método A1 com a carga superficial das AgNP sintetizadas de acordo com o método A2 com valores de -39 e -30 mV, respectivamente, é possível observar que para as AgNP sintetizadas de acordo com o método A2 há uma remoção da camada estabilizadora de citrato devido a presença do PVA.

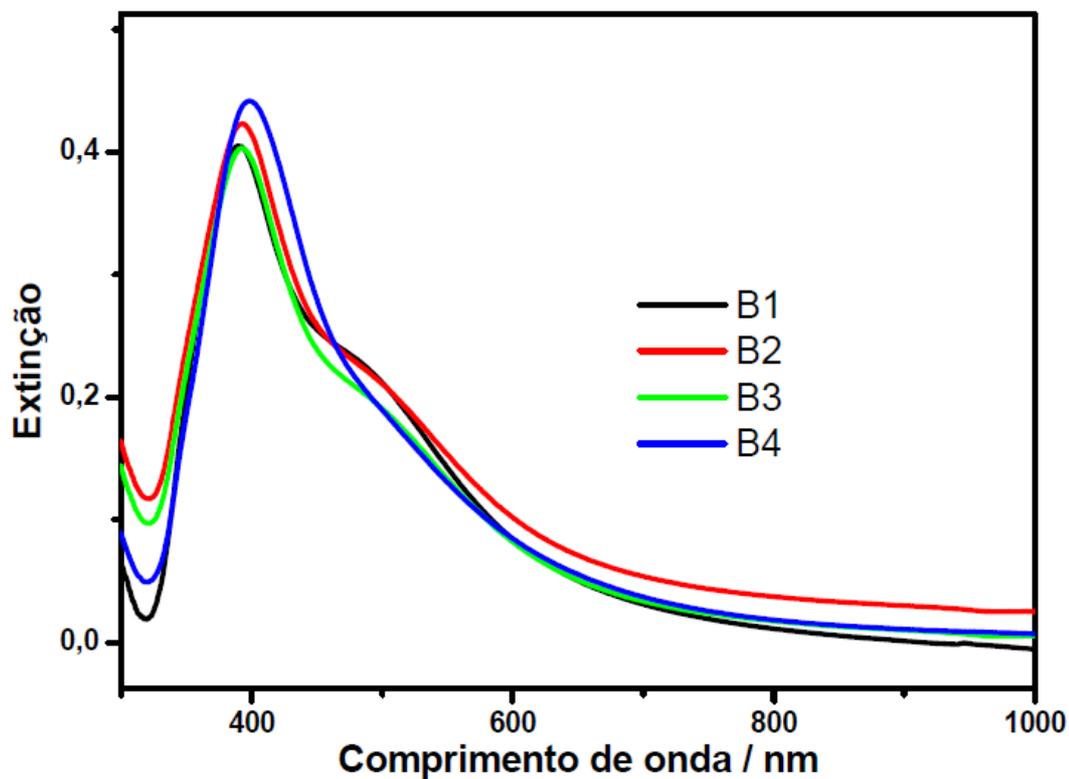
#### 4.3. ESPECTROS UV-VIS DOS COLOIDES SINTETIZADOS DE ACORDO COM O MÉTODO B

As AgNP sintetizadas de acordo com o método B, foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, na obtenção das imagens TEM das bactérias *K. pneumoniae* e *S. aureus* na presença dessas AgNP e na tentativa de se construir uma curva analítica para entender a liberação do antibiótico TC no meio biológico. Esses ensaios são importantes para se compreender a ação dessas AgNP *in vitro* e viabilizar possíveis aplicações futuras *in vivo*.

Estudos prévios foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Claudio Galuppo Diniz do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, a fim de se verificar efeitos de sinergia da combinação de AgNPs, QUIT e antibióticos *in vitro*, onde observou-se que para a combinação AgNPs, QUIT e os antibióticos amicacina, gentamicina, meropenem, TC e levofloxacina frente as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis* o efeito antibacteriano foi sinérgico.

A Figura 16 mostra o espectro UV-VIS de diferentes sínteses de AgNPs recobertas com QUIT, onde observa-se um máximo de extinção em *ca.* 390 nm, característico de AgNPs de 5-15 nm e um ombro em *ca.* 530 nm característico do acoplamento do plásmon de superfície das AgNPs precursoras (5-15 nm) induzidas pela presença da QUIT, com formação de partículas (15-30 nm). Como podemos observar na Figura 16 diferentes sínteses de AgNPs apresentaram a mesma forma de linha com a mesma distribuição de tamanhos, onde podemos concluir que estas sínteses foram reprodutíveis na distribuição de tamanhos e apresentaram tamanhos pequenos o suficiente para maximizar a ação antibacteriana.

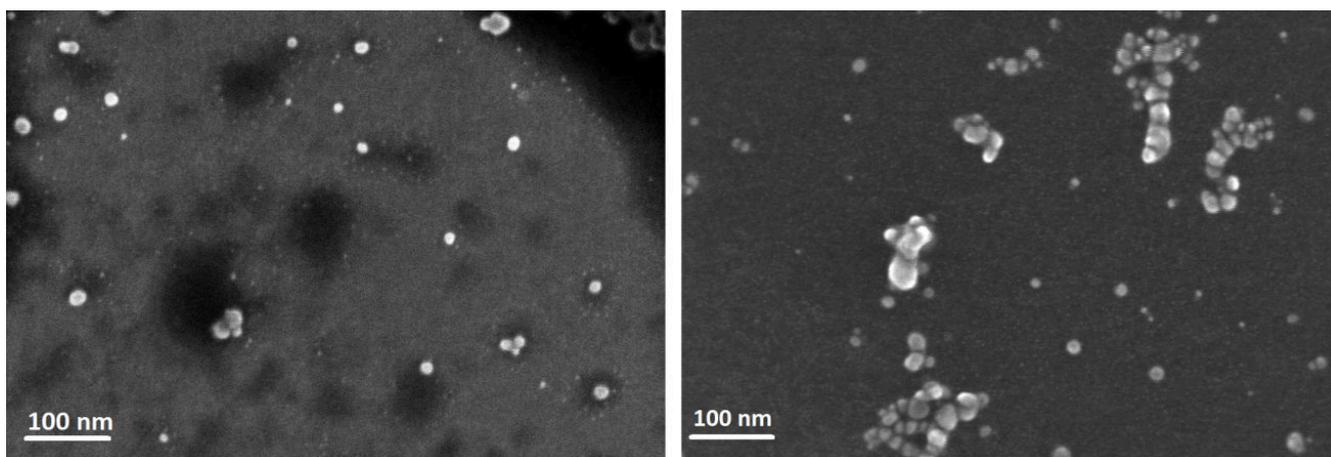
Figura 16: Espectros UV-VIS das AgNP preparadas de acordo com o método B.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A Figura 17 mostra as imagens SEM do coloide B1, onde observamos AgNPs com tamanhos que variam de 5-30 nm, com predominância de AgNPs de diâmetros de 5-10 nm.

Figura 17: Imagens SEM do coloide B1



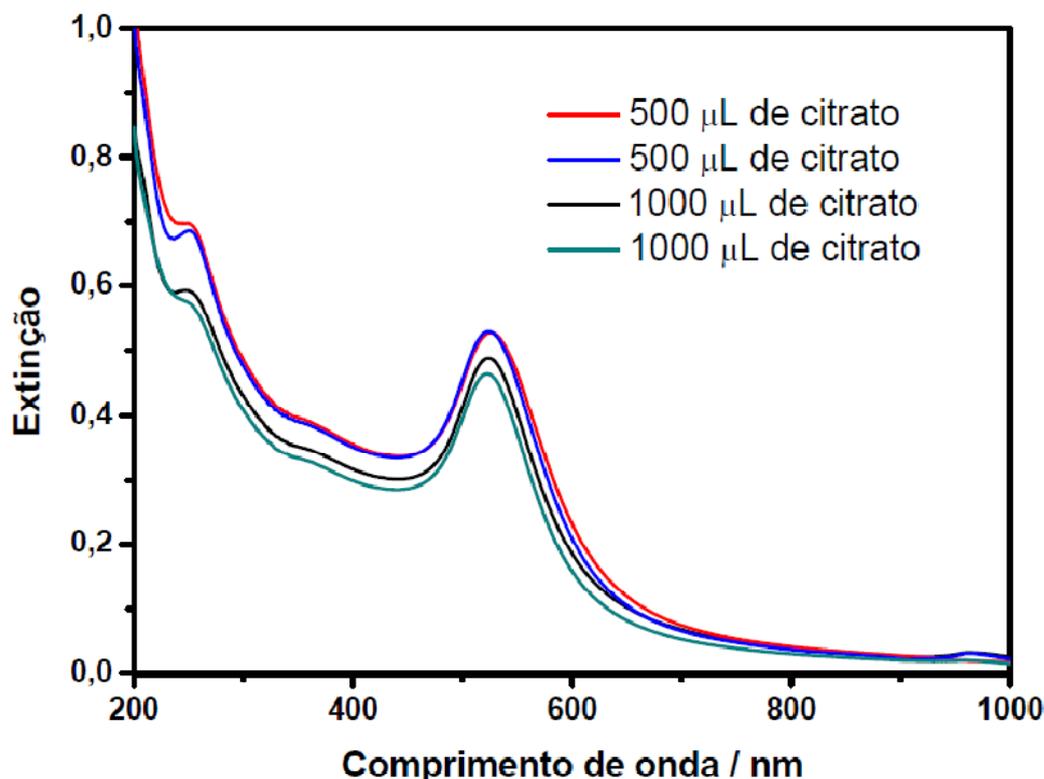
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.4. ESPECTROS UV-VIS DO COLOIDE SINTETIZADO DE ACORDO COM O MÉTODO C.

As AuNP sintetizadas de acordo com o método C seguiram a metodologia descrita por Frens (FRENS, 1973). A Figura 18 mostra o espectro UV-VIS das AuNP obtidas de acordo com este método utilizando-se 500 e 1000  $\mu\text{L}$  de citrato. Há formação de AuNP com máximo de extinção em *c.a.* 520 nm característico das AuNP.

De acordo com o artigo da síntese original, a quantidade de citrato utilizada interfere no tamanho das AuNP obtidas. Foi observado que para maiores quantidades de citrato há predominância de AuNP com tamanhos pequenos, e que a diminuição da quantidade de citrato utilizada na síntese, provoca o deslocamento do máximo de extinção do coloide para região do vermelho. Devido a isto, os coloides sintetizados com 500  $\mu\text{L}$  de citrato foram escolhidos para se obter os espectros SERS da RP (FRENS, 1973).

Figura 18: Espectro UV-VIS das AuNP obtidas de acordo com o método C.



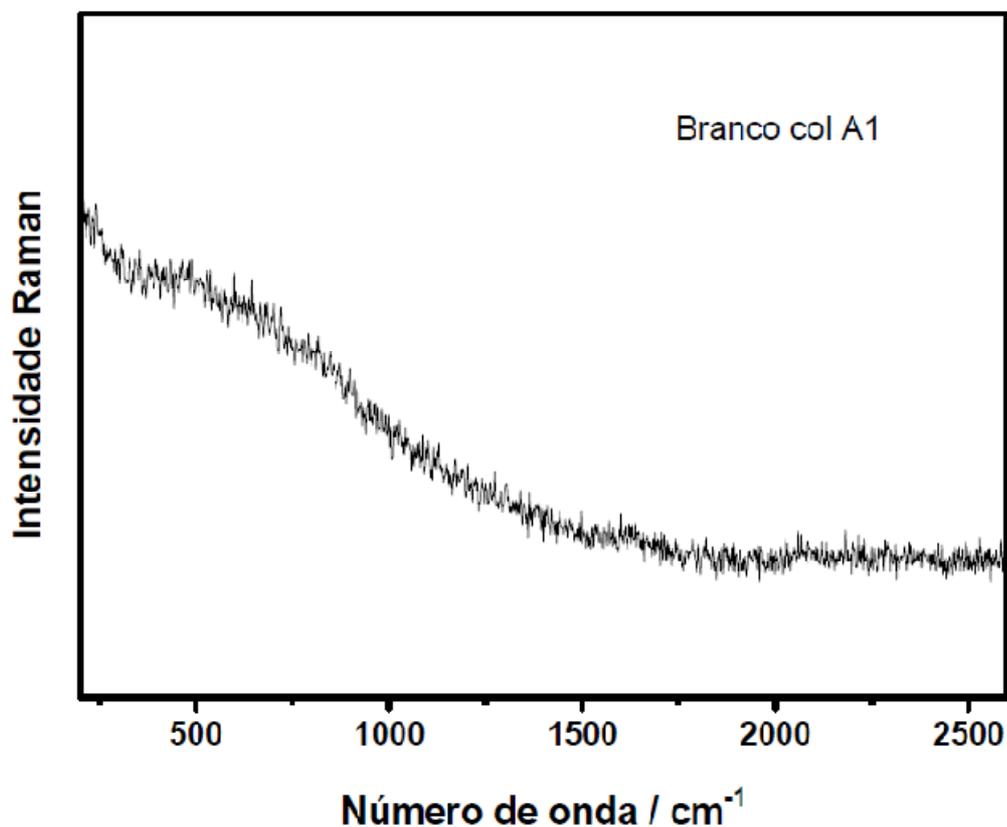
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.5. ESPECTROSCOPIA SERS E UV-VIS

Neste trabalho foram escolhidos os antibióticos metronidazol (MT), aztreonam (AZ) e rifampicina (RP) e o antifúngico tinidazol (TI) para o estudo da adsorção sobre superfície de prata através das técnicas de espectroscopia SERS e LSPR. Para isso foram utilizados os colóides do tipo A1 e A2. Essa escolha foi baseada, no fato dessas moléculas não apresentarem espectros SERS publicados na literatura com exceção da RP e do MT que apresentam espectros SERS reportados por Howes *et al.* e por Han *et al.*, respectivamente (HAN, C. *et al.*, 2014; HOWES *et al.*, 2007; HOWES *et al.*, 2006). No entanto, o primeiro faz a atribuição vibracional da RP baseado em moléculas similares presentes na literatura, não realizando cálculos teóricos para inferir o sítio de interação da RP sobre a superfície metálica da prata; enquanto que no segundo os autores não discutem o sítio molecular que está envolvido na adsorção do MT sobre a superfície metálica da prata.

Para a obtenção dos espectros SERS dos adsorbatos é ideal que o espectro SERS do branco das AgNP não apresente sinal. Na Figura 19 está representado o espectro SERS do branco do colóide A1 obtido utilizando radiação excitante de comprimento de onda em 633 nm. Como podemos observar o colóide sintetizado na presença de borohidreto e citrato não apresenta sinal SERS, o que torna essa síntese ideal para a obtenção dos espectros SERS destes adsorbatos.

Figura 19: Espectro SERS do branco do colóide A1



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

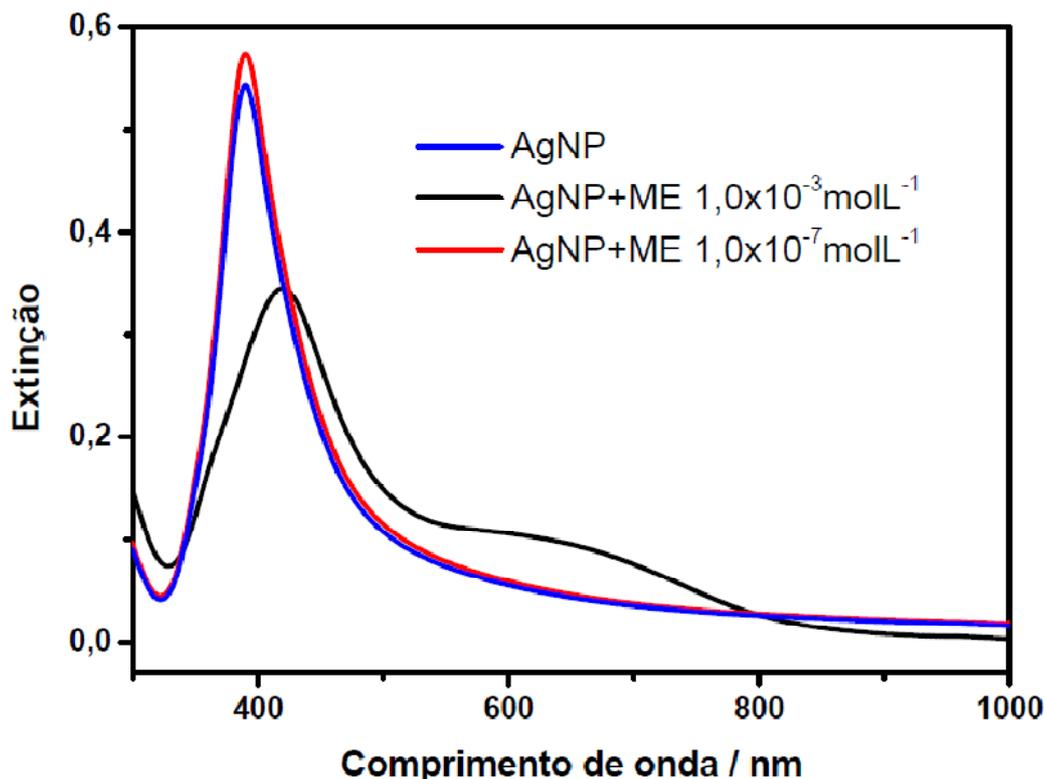
A seguir serão discutidos os espectros SERS dos adsorbatos estudados e os possíveis sítios de interação dessas moléculas em relação as superfícies metálicas de prata ou ouro.

#### 4.5.1. Mercaptoetanol (ME)

Neste trabalho, o ME foi uma das moléculas utilizadas para a modificação química da superfície das AgNP. Esta permite a interação com o adsorbato através de ligação de hidrogênio e com o substrato metálico através do átomo de enxofre. Além disso, a escolha de um modificador superficial adequado é de extrema importância para o emprego dessas nanopartículas em sistemas biomédicos (FONSECA, 2016). A Figura 20 mostra a agregação das AgNP na presença do 2-mercaptoetanol em diferentes concentrações. Como podemos observar na Figura 20 a presença de ME na concentração de  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  que corresponde a concentração de submonocamada não provoca agregação das AgNP, enquanto a adição de ME sobre a superfície

metálica das AgNP na concentração  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  provoca um deslocamento do máximo de extinção *c.a.* 420 nm com um alargamento da banda LSPR, bem como a formação de um ombro em *c.a.* 647 nm devido ao acoplamento do plásmom dos agregados de nanopartículas.

Figura 20: Espectros UV-VIS das AgNP na presença e ausência do ME. Caminho ótico: 1mm.

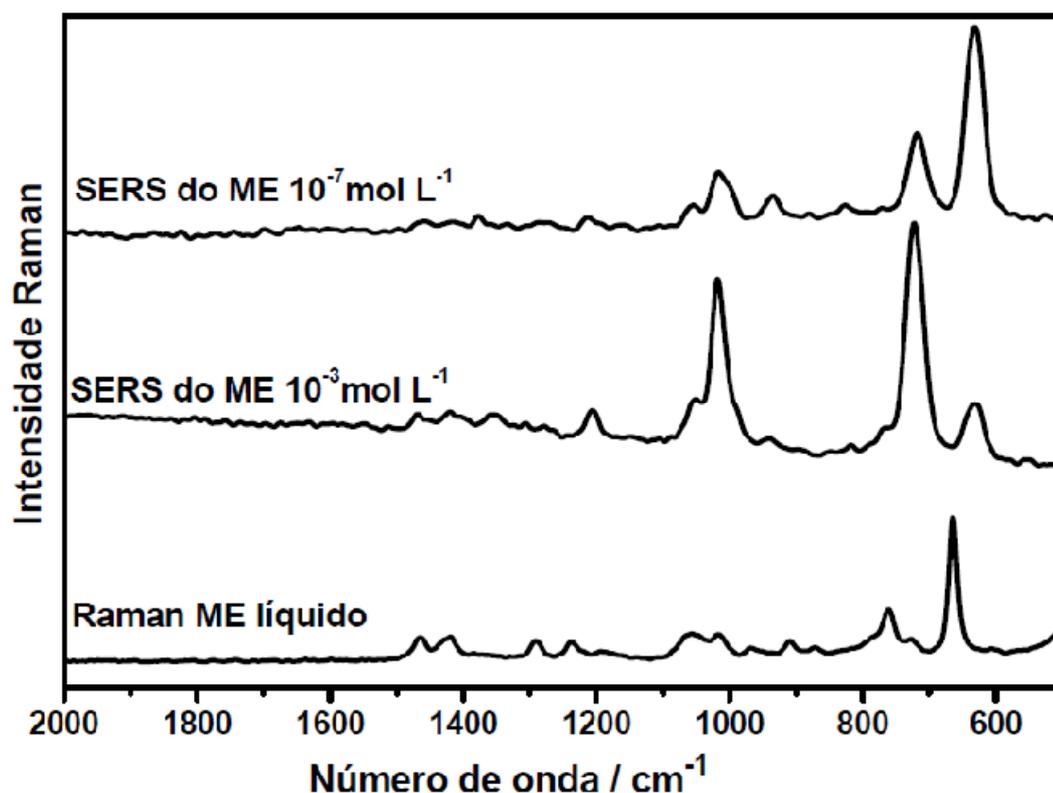


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O efeito da concentração do 2-mercaptoetanol também influencia o espectro SERS dessa molécula (FONSECA, 2016). A Figura 21 mostra o espectro Raman e SERS do ME obtido em diferentes concentrações. As bandas Raman em 665 e 761  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento CS característico para as conformações gauche e trans, respectivamente (KUDELSKI, 2003). Nos espectros SERS, observa-se o deslocamento dessas bandas para 630 e 720  $\text{cm}^{-1}$ , além da mudança na intensidade relativa entre essas duas bandas devido ao uso de diferentes concentrações de ME. A concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  apresenta maior intensidade da banda SERS em 720  $\text{cm}^{-1}$  quando comparada com a banda SERS em 630  $\text{cm}^{-1}$ . Neste caso, há

predominância da conformação trans, que se torna mais favorável devido a interações entre moléculas do ME adsorvido. Em condição de submonocamada (concentrações menores que  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>), esta intensidade relativa é invertida. Isto nos faz supor que a conformação gauche se mostra mais favorável em concentrações de submonocamada por não haver interação lateral com outras moléculas de ME (FONSECA, 2016)

Figura 21: Espectros Raman e SERS do ME em diferentes concentrações



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

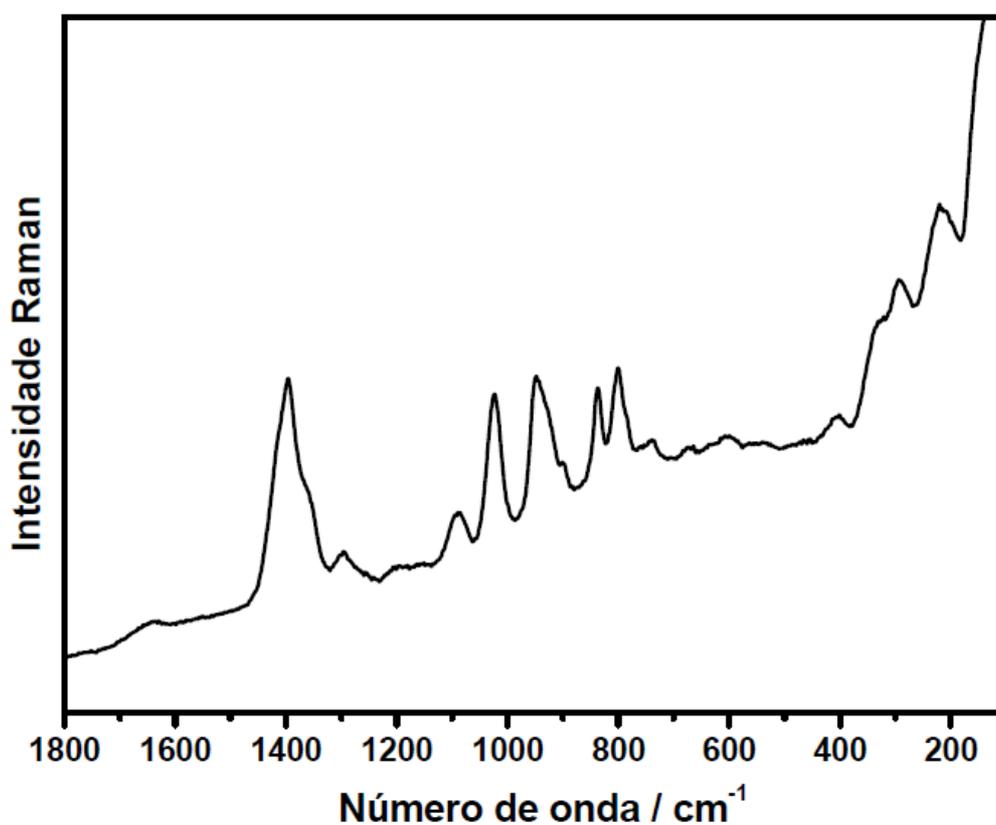
#### 4.5.2. Polivinil álcool PVA

O PVA foi escolhido como modificador de superfície para obtermos o espectro SERS do MT. A presença do PVA como modificador de superfície promove a estabilização da suspensão coloidal, e também permite o ancoramento do MT via ligação de hidrogênio com a superfície metálica da prata. No entanto, no espectro do branco do coloide observamos as bandas SERS características do PVA adsorvido sobre as AgNP. Devido ao fato dessas bandas interferirem na análise da adsorção do

MT sobre estas AgNP foi realizado a subtração do espectro SERS do branco do coloide. A Figura 22 mostra o espectro SERS do coloide de prata A2.3 sintetizado na presença do PVA.

O PVA é um agente estabilizante muito utilizado na síntese de AgNP e na obtenção de espectros SERS de moléculas marcadoras que apresentam uma alta relação sinal/ ruído (LIU et al., 2013; SI; KANG; ZHANG, 2009; VOLKAN; STOKES; VO-DINH, 2000). Nestes, o espectro SERS do branco do coloide apresenta o mesmo conjunto de bandas apresentados na Figura 22. No entanto, devido ao fato das moléculas estudadas apresentarem uma alta relação sinal/ruído, o sinal SERS dessas moléculas encobre o sinal SERS do branco, não sendo necessária a subtração do sinal SERS do branco do coloide. Neste trabalho, foi necessário realizar a subtração do sinal SERS do branco do coloide, uma vez que o espectro SERS do MT apresentou interferência das bandas do branco do coloide. Tal subtração é apresentada na seção 4.5.4

Figura 22: Espectro SERS do branco do coloide A2.3.



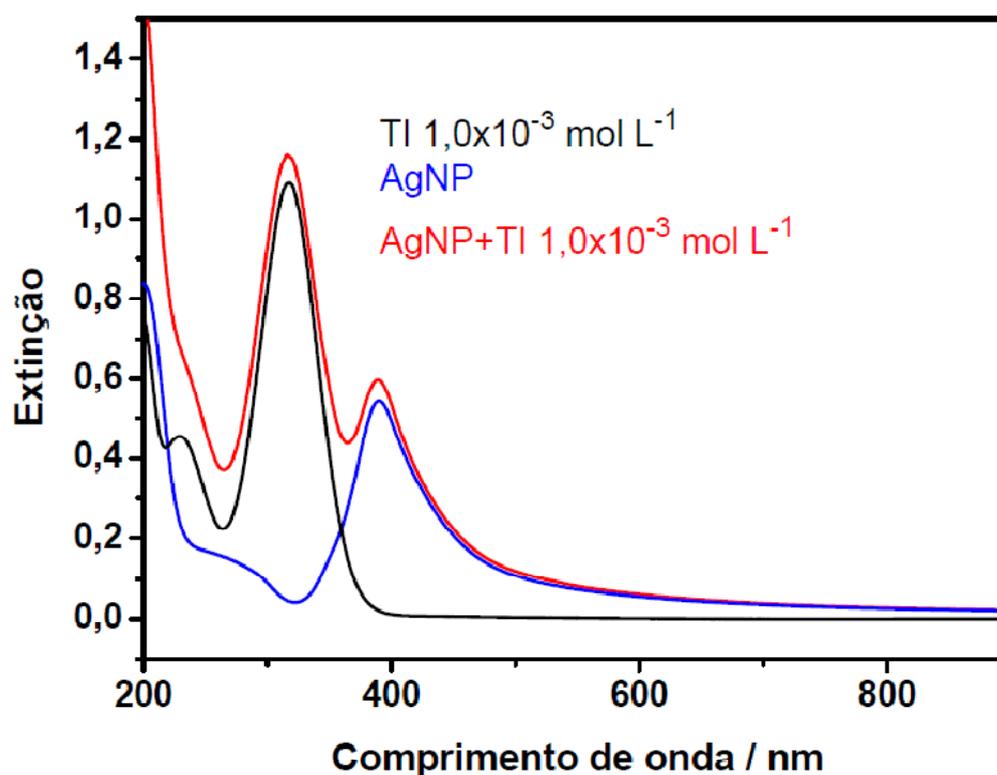
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

### 4.5.3. Tinidazol (TI)

#### 4.5.3.1. Espectros de extinção das AgNP na presença e ausência do TI

A Figura 23 mostra os espectros UV-VIS da solução de TI e da suspensão de AgNP na ausência e presença do TI. A solução de TI apresenta um máximo de absorção em 317 nm atribuído a transição eletrônica  $n \rightarrow \pi^*$  (GUNASEKARAM; ANITTA, 2009). A adição do TI sobre as AgNP, imediatamente preparadas, não provoca deslocamentos do máximo de extinção da suspensão de AgNP, preservando o formato da banda de extinção das AgNP e a banda de absorção do TI.

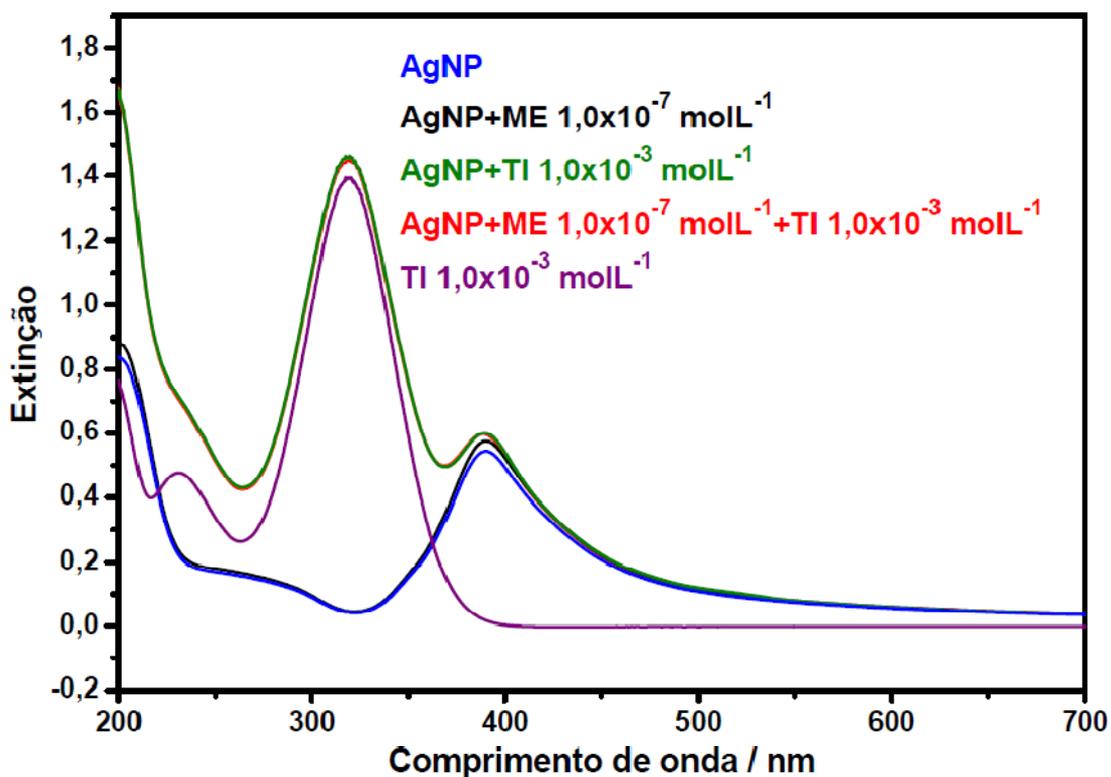
Figura 23: Análise da adsorção do TI em AgNP por espectroscopia UV-VIS



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O mesmo comportamento foi observado quando foram obtidos os espectros do TI na presença das AgNP modificadas com mercaptoetanol na concentração  $1,0 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> que corresponde a concentração de submonocamada. A Figura 24 mostra os espectros UV-VIS da solução de TI e da suspensão de AgNP modificadas quimicamente ou não com 2-mercaptoetanol na ausência e presença do TI.

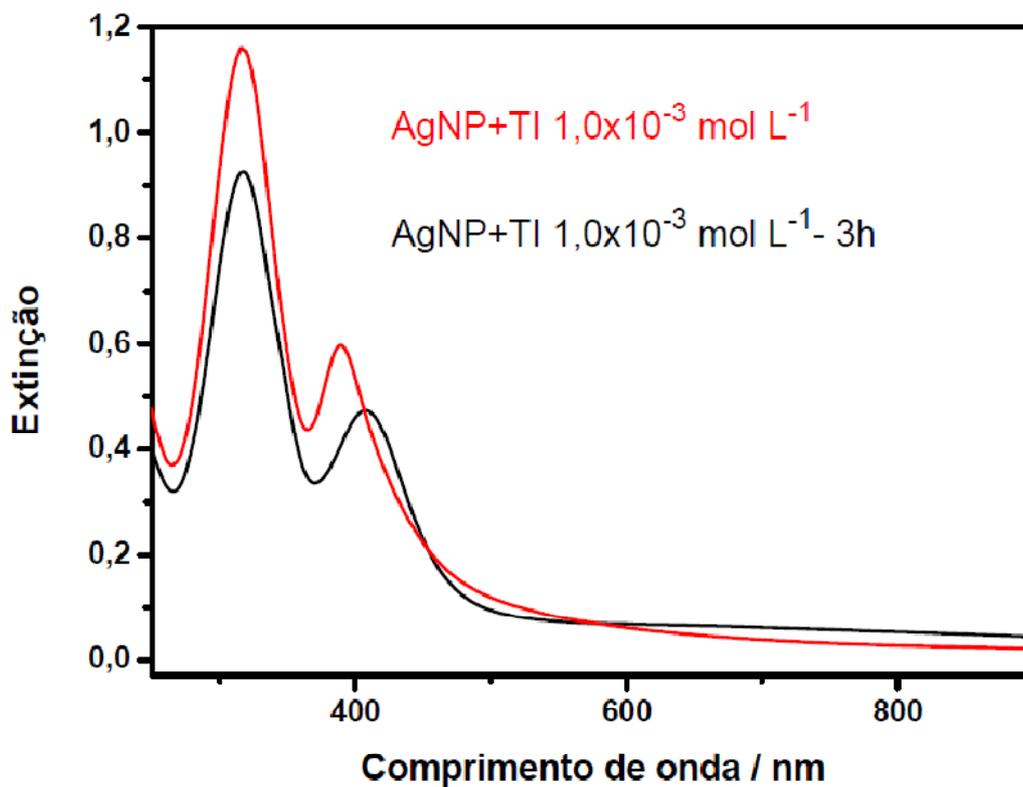
Figura 24: Análise da adsorção do TI em AgNP modificadas ou não por 2-mercaptoetanol por espectroscopia UV-VIS



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

No entanto, após 3 h de adsorção do TI sobre a superfície das AgNP ocorreu um deslocamento do máximo de extinção do coloide de 390 nm para 409 nm, o que indica um processo de agregação das AgNP devido a presença do TI. A Figura 25 mostra este processo de agregação.

Figura 25: Agregação das AgNP na presença do TI imediatamente preparadas e após 3 h de adsorção

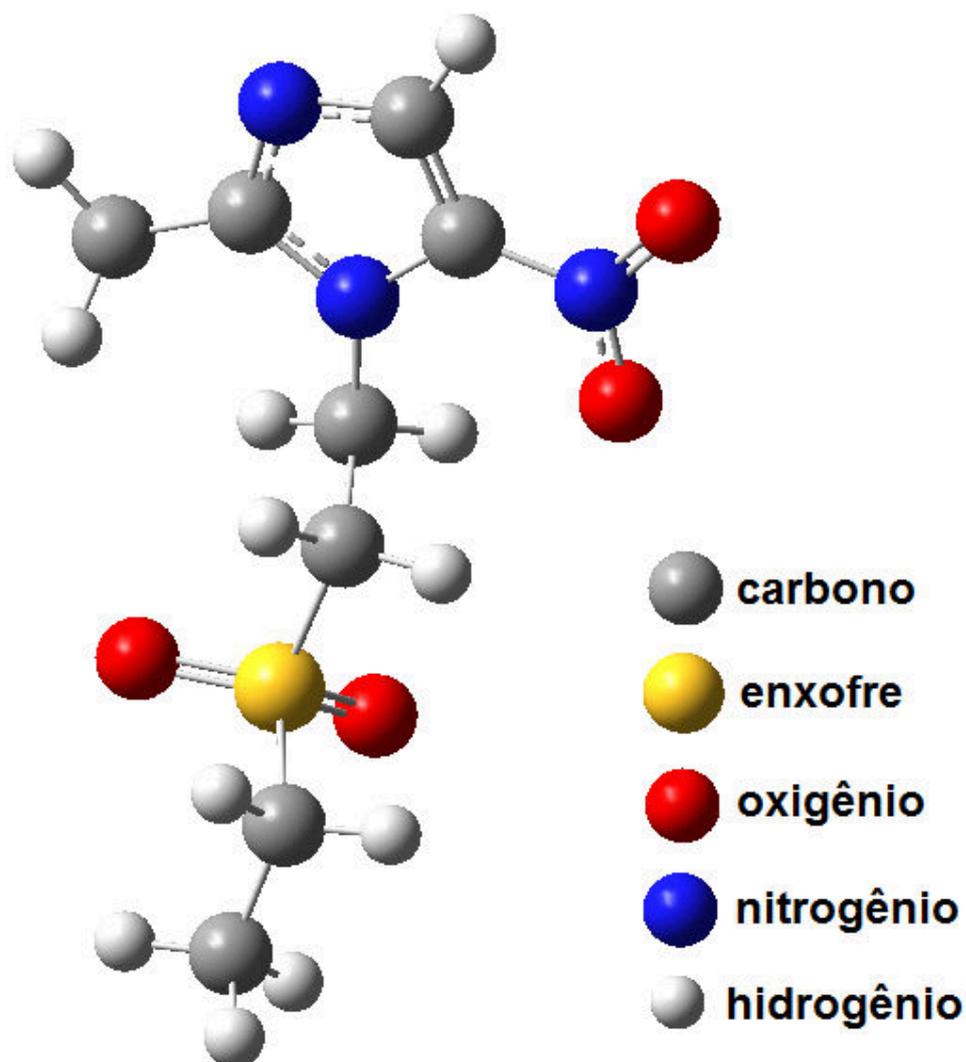


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.5.3.2 Espectro Raman e SERS do TI

A Figura 26 mostra a geometria otimizada do TI através de cálculos DFT. O  $pK_a$  do TI é 2,30 e envolve a protonação do nitrogênio 3 do anel imidazólico. Portanto, tanto no estado sólido, quanto em solução em  $pH=6$  a espécie predominante é a espécie neutra (ŞANLı et al., 2013). As cores dos átomos utilizados na Figura 26 também foram consideradas nas demais Figuras desta tese.

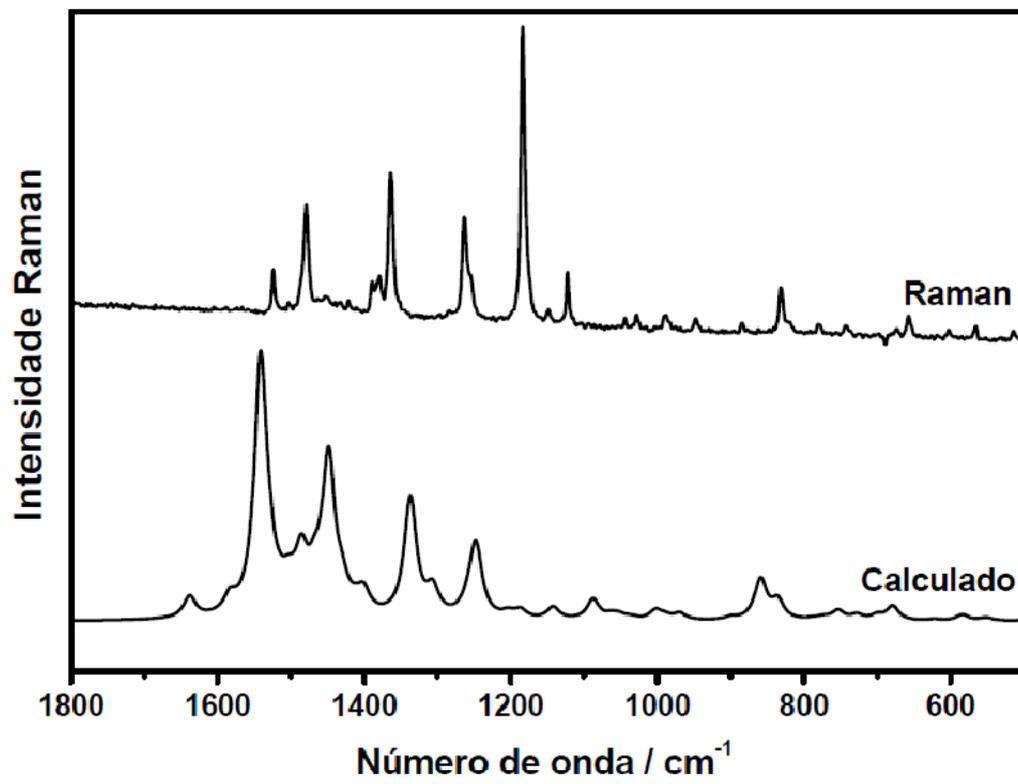
Figura 26: Geometria otimizada do TI junto com os átomos rotulados



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 27 mostra o espectro Raman do TI junto com o espectro Raman calculado. Observa-se que os espectros Raman experimental e teórico apresentam divergência nos valores dos números de onda, também presente na Tabela 1. Isto é uma consequência da anarmonicidade não considerada nos cálculos DFT. Por isso, para realizar-se as atribuições vibracionais os valores de número de onda foram corrigidos por um fator de 0,9 na região entre 1700-1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 27: Espectros Raman do TI experimental e teórico



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 1: Atribuições vibracionais do espectro Raman do TI obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada.

Raman	TI (Calc.)	Atribuição
1525	1638	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{ant}}$
1479	1541	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \nu(\text{CC})_{\text{cl}}$
1388	1485	$\nu(\text{C-NO}_2) + \delta(\text{CH}_3)$
1380	1468	$\delta(\text{CH}_2)_{\text{sci}}$
1365	1448	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}} + \nu(\text{C-NO}_2) + \nu(\text{CN})_{\text{im}} + \delta(\text{CH}_3)$
1262	1337	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}}$
1254 <sub>(sh)</sub>	1307	$\nu(\text{SO}_2) + \delta(\text{CH}_2)_{\tau}$
1183	1248	$\nu(\text{NC})_{\text{cl}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im}}$
831	859	$\delta(\text{NO}_2) + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im}}$
-	-	$\delta(\text{CC,CN})_{\text{oop}} + \delta(\text{CNO}_2)_{\text{oop}}$
		$\delta(\text{CC,CN})_{\text{skl}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im.oop}}$

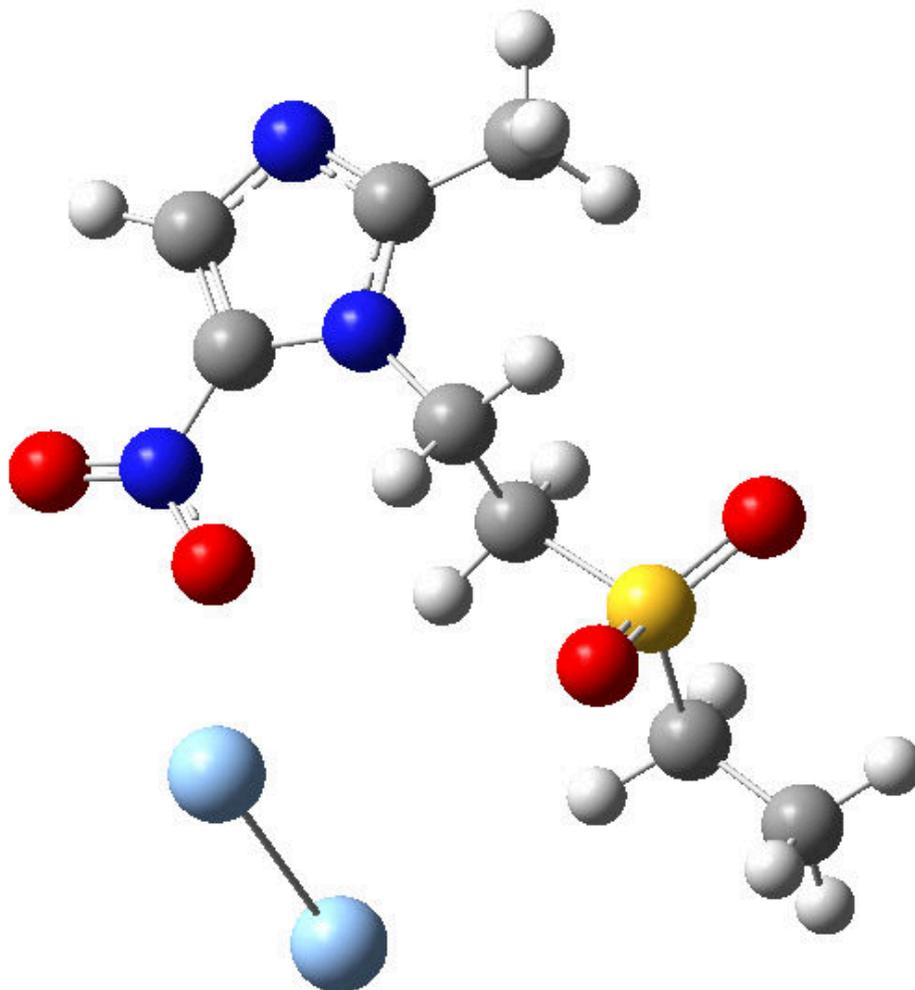
ant – estiramento antissimétrico; im – anel imidazólico; cl – cadeia lateral; sci – tesoura; sim – estiramento simétrico;  $\tau$  - twiste; oop – fora do plano; skl – esqueleto.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

As bandas Raman em 1525, 1365 e 831  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas principalmente aos estiramentos antissimétrico e simétrico e a deformação angular do grupo nitro, respectivamente. As bandas Raman em 1479 e 1183  $\text{cm}^{-1}$  possuem contribuição dos estiramentos CC,CN do anel imidazólico, junto com contribuições de estiramento CC ou CN da cadeia lateral.

A Figura 28 mostra o modelo teórico do TI interagindo com 2 átomos de prata, otimizado através de cálculos DFT, e utilizado na atribuição do espectro SERS.

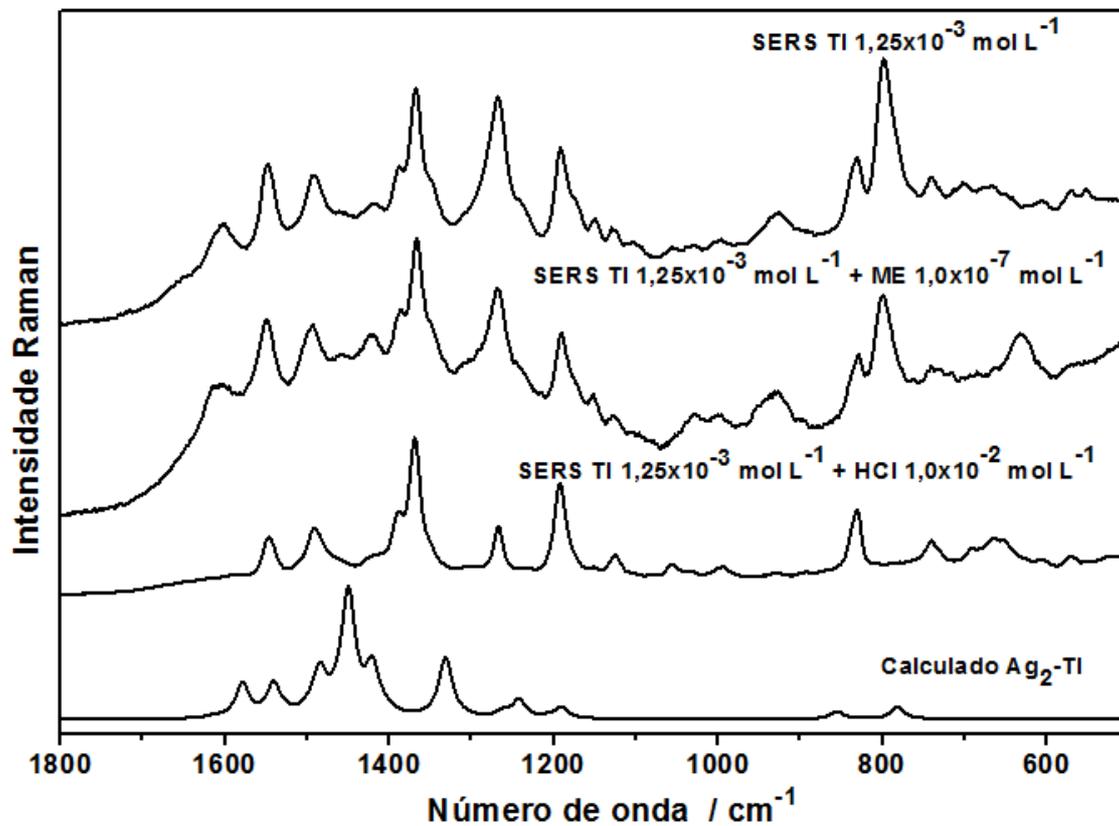
Figura 28: Geometria otimizada do TI interagindo com 2 átomos de prata.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 29 mostra os espectros SERS do TI obtidos na ausência, na presença de 2-mercaptoetanol e na presença de HCl, junto com o espectro Raman calculado para o TI interagindo com 2 átomos de prata. A atribuição vibracional do espectro SERS está apresentada na Tabela 2.

Figura 29: Espectros SERS do TI na ausência e presença dos modificadores de superfície ME e HCl junto com o espectro Raman calculado para o modelo do complexo de superfície



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Tabela 2: Atribuição vibracional dos espectros SERS do TI adsorvido sobre AgNP na ausência, na presença de 2-mercaptoetanol e ácido clorídrico obtidas a partir de cálculos teóricos do TI interagindo com 2 átomos de prata.

SERS AgNP	SERS AgNP + ME	SERS AgNP + HCl	TI - Ag (Calc.)	Atribuição
1620				795+832
1602	1610	-	-	2x795
1548	1549	1547	1613	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{ant}}$
1492	1495	1490	1541	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \nu(\text{CC})_{\text{cl}}$
1390	1388	1388	1484	$\nu(\text{C-NO}_2) + \delta(\text{CH}_3)$
-	-	-	-	$\delta(\text{CH}_2)_{\text{sci}}$
1369	1368	1368	1449	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}} + \nu(\text{C-NO}_2)$ $+ \nu(\text{CN})_{\text{im}} + \delta(\text{CH}_3)$
1268	1268	1268	1332	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}}$
1242	1241	-	1308	$\nu(\text{SO}_2) + \delta(\text{CH}_2)_{\tau}$
1192	1191	1191	1242	$\nu(\text{NC})_{\text{cl}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im}}$
832	831	832	856	$\delta(\text{NO}_2) + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im}}$
795	796	-	783	$\delta(\text{CC,CN})_{\text{oop}} + \delta(\text{CNO}_2)_{\text{oop}}$
572			584	$\delta(\text{CC,CN})_{\text{skl}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im,oop}}$

ant – estiramento antissimétrico; im – anel imidazólico; cl – cadeia lateral; sci – tesoura; sim – estiramento simétrico;  $\tau$  - twiste; oop – fora do plano; skl – esqueleto.

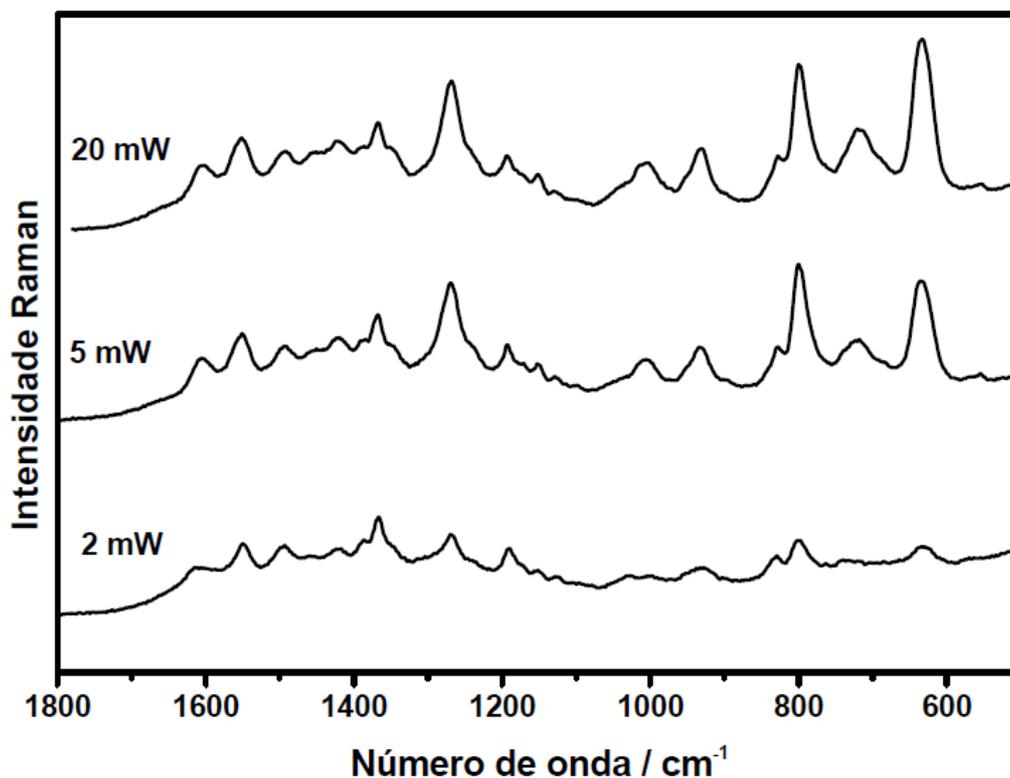
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

As intensas bandas SERS em 1548, 1369 e 830  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos antissimétrico, simétrico e a deformação angular do grupo nitro, respectivamente, mostraram-se intensificadas e alargadas quando comparadas com as bandas em 1525, 1365 e 831  $\text{cm}^{-1}$  presentes no espectro Raman normal do TI. Tais diferenças permitem sugerir que o grupo nitro é o sítio molecular comprometido com interação com a superfície metálica da prata. A intensificação da banda SERS em 795  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída a deformação angular do anel imidazólico fora do plano junto com a deformação angular do grupo nitro sugerem que o anel imidazólico está em ângulo em relação a superfície metálica da prata.

As bandas SERS na região espectral entre 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$ , características do anel imidazólico foram discutidas na literatura por vários autores (BUKOWSKA; KUDELSKI; JACKOWSKA, 1991; CARTER; PEMBERTON, 1992; LOO et al., 2006; XUE et al., 1988). Carter e Pemberton obtiveram o espectro SERS de diferentes espécies do imidazol em pH 9 e pH 2 adsorvida em eletrodo de prata. A banda SERS em 1600  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída a decomposição do anel imidazólico devido a processos de fotólise (CARTER; PEMBERTON, 1992). Bukowska *et al.* sugeriram que as bandas infravermelho do anion imidazolato são observadas nesta região e também podem ser observadas no espectro SERS desta espécie (BUKOWSKA et al., 1991). A evidência de que o anel imidazólico está ou não envolvido em um processo de fotólise pode ser monitorada através da variação da potência do laser incidido sobre a amostra. Neste caso, se a banda SERS em 1600  $\text{cm}^{-1}$  é devida a contaminação pela decomposição parcial do anel imidazólico, esta deveria ser intensificada com o aumento da potência do laser. No entanto, isto não é observado para potências acima de 20 mW. Além disso, as bandas SERS em 1492, 1268, 1192 e 832  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas a modos normais que envolvem as vibrações do anel imidazólico estão intensificadas nos espectros SERS, sendo esta também uma evidência de que o imidazol não está envolvido em processos de fotodecomposição.

A Figura 30 mostra o espectro SERS do TI obtidos na presença de 2-mercaptoetanol variando-se a potência do laser

Figura 30: Efeito da potência do laser nos espectros SERS do TI adsorvido sobre AgNP modificadas quimicamente com 2-mercaptoetanol



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

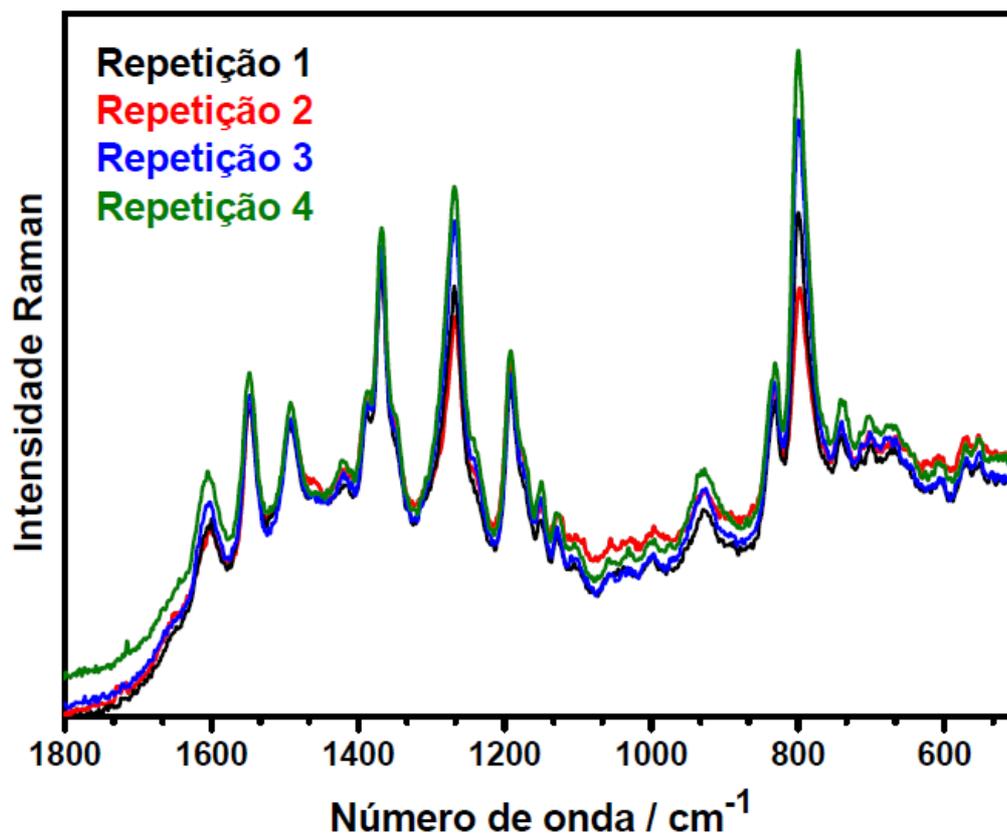
Arjunan *et al.* no estudo do espectro infravermelho do 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol atribuiu bandas harmônicas e de combinação envolvendo modos de deformação angular do grupo nitro na região espectral 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$  (ARJUNAN *et al.*, 2014). É possível a observação de bandas harmônicas e de combinação no espectro SERS (AROCA, 2006). Baseados, nessa discussão as bandas SERS do TI observadas em 1620 e 1602  $\text{cm}^{-1}$ , podem ser atribuídas como harmônica e banda de combinação das bandas SERS em 795 e 835  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

Na presença do 2-mercaptoetanol, o espectro SERS do TI mostra uma diminuição na intensidade relativa das bandas SERS em 1268 e 795  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas as vibrações do imidazol. A última, atribuída a modos fora do plano do anel, permitem inferir que o anel imidazólico está mais perpendicular em relação a superfície metálica da prata e que o 2-mercaptoetanol opera como um espaçador. Esta tendência é reforçada pelo espectro SERS do TI na presença de HCl, que apresenta um padrão espectral SERS bem próximo do padrão espectral Raman no estado sólido com perdas nas intensidades relativas das bandas SERS em 1602, 1548, 1268 e 795  $\text{cm}^{-1}$ . Este

comportamento diferente pode ser explicado supondo que a adsorção ocorra através par iônico, envolvendo o nitrogênio 3 protonado e o íon cloreto adsorvido sobre a superfície metálica da prata. A ausência da banda SERS em  $795\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a modos fora do plano está diretamente relacionada com decréscimo das bandas SERS na região entre  $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ , reforçando a presença de bandas harmônicas e de combinação nesta região.

Foi realizado ainda, o estudo da reprodutibilidade dos espectros SERS do TI em diferentes dias, utilizando-se um intervalo de 1 semana entre os espectros. A Figura 31 mostra os espectros SERS do TI para diferentes repetições. Há certa reprodutibilidade dos espectros obtidos. O estudo da reprodutibilidade nos experimentos SERS é importante, uma vez que é conhecida a forte dependência com o substrato metálico que deve estar em ressonância com a radiação excitante utilizada nos experimentos SERS, a estabilidade do substrato metálico e o tempo de preparo das sínteses, o qual promove a deposição de carbono que pode interferir nos espectros SERS.

Figura 31: Estudo da reprodutibilidade dos espectros SERS do TI.



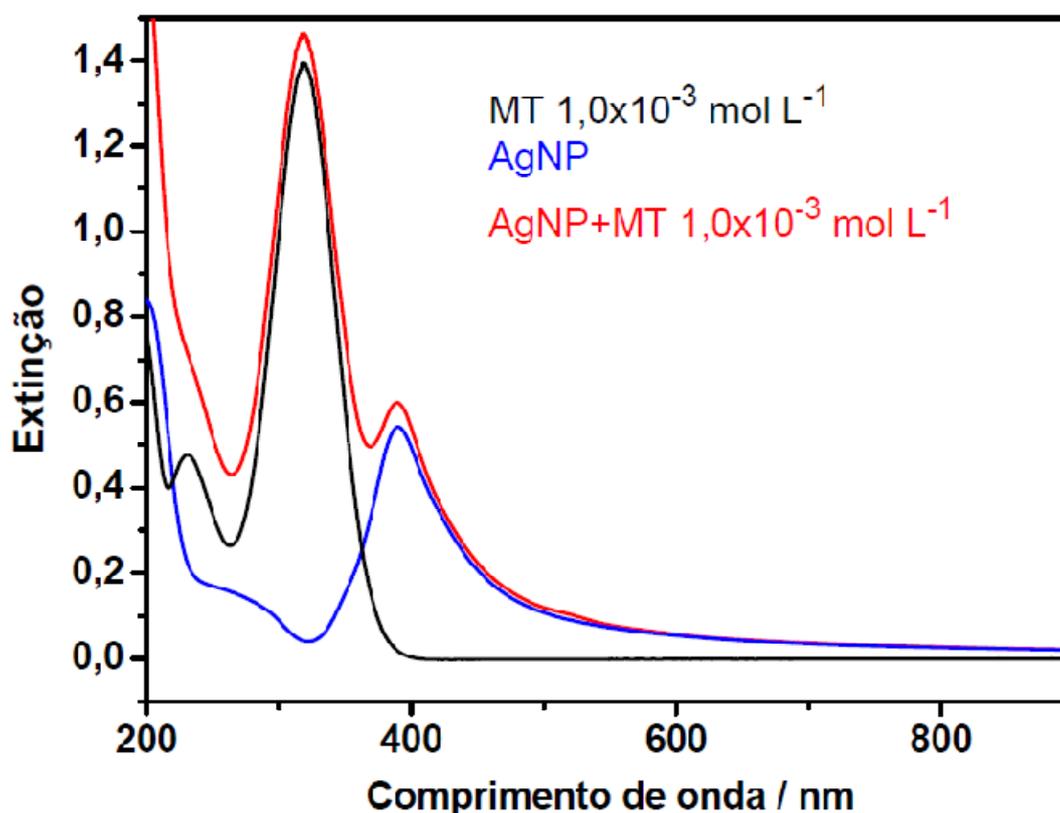
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.5.4. Metronidazol (MT)

##### 4.5.4.1. Espectros de extinção das AgNP na presença e ausência do MT

O MT, assim como o TI, pertence a classe do nitroimidazol, apresentando o mesmo grupo cromóforo com máximo de absorção em 317 nm, e devido a isso o espectro UV-VIS do MT é muito parecido com o espectro UV-VIS do TI (GUNASEKARAM; ANITTA, 2009). A Figura 32 mostra os espectros UV-VIS da solução de MT e da suspensão de AgNP na ausência e presença do MT. Assim como observado para o TI, a adição do MT sobre as AgNP, imediatamente preparadas, não provoca deslocamentos do máximo de extinção da suspensão de AgNP, preservando o formato da banda de extinção das AgNP e a banda de absorção do MT.

Figura 32: Análise da adsorção do MT em AgNP por espectroscopia UV-VIS

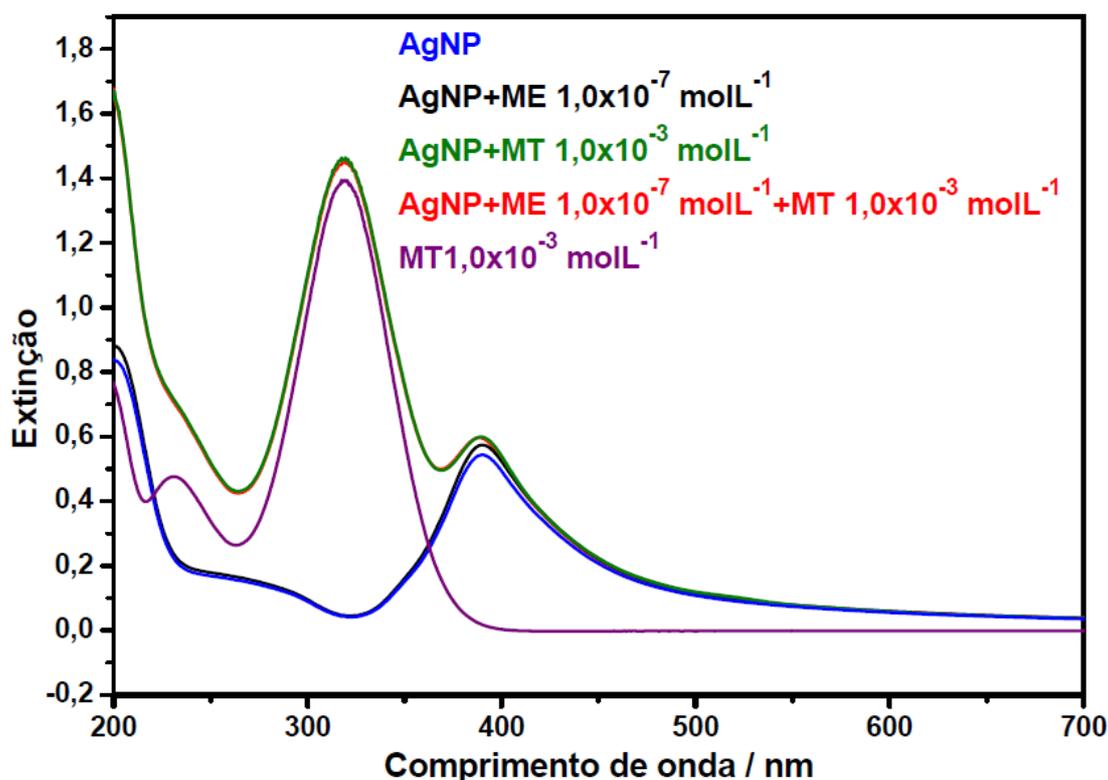


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Assim como no TI, a presença do 2-mercaptoetanol na concentração de submonocamada ( $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ) não provocou agregação das AgNP e não alterou a banda de absorção do MT.

A Figura 33 mostra os espectros UV-VIS da solução de MT e da suspensão de AgNP modificadas quimicamente ou não com 2-mercaptoetanol obtidos na ausência e presença do MT.

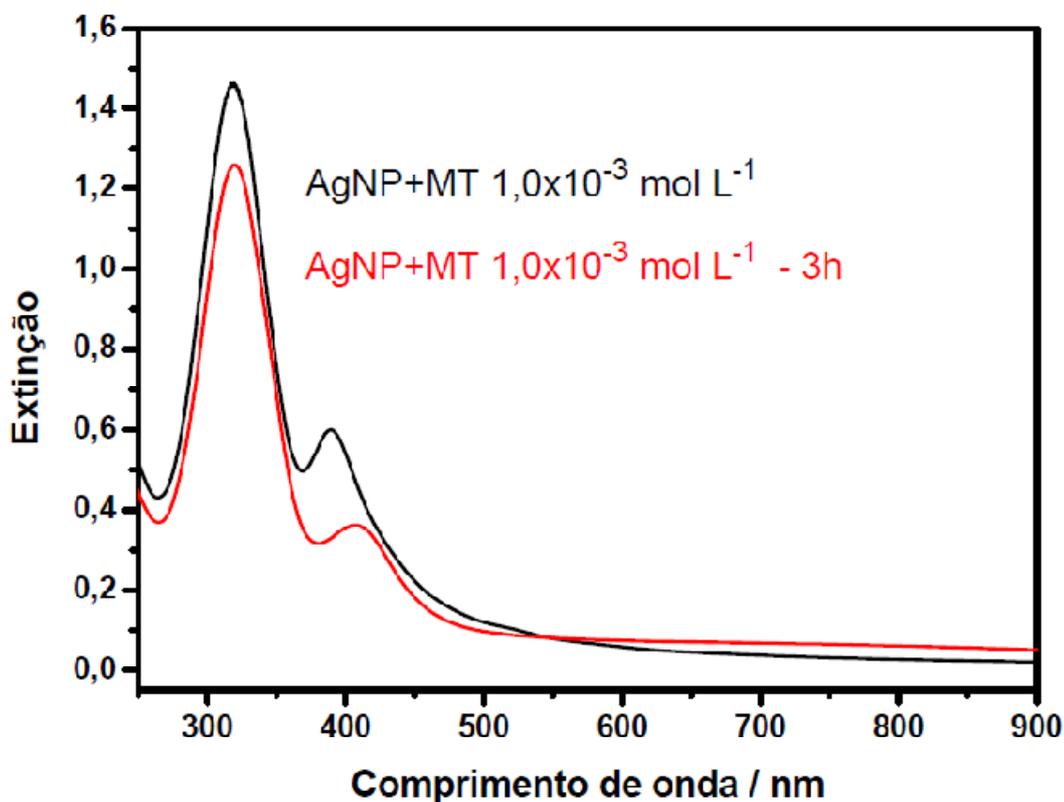
Figura 33: Análise da adsorção do MT em AgNP modificadas ou não por 2-mercaptoetanol por espectroscopia UV-VIS



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Do mesmo modo que o observado para o TI, após 3 h de adsorção do MT sobre a superfície das AgNP ocorreu um deslocamento do máximo de extinção do coloide de 390 para 409 nm, o que indica um processo de agregação das AgNP devido a presença do MT. A Figura 34 mostra este processo de agregação.

Figura 34: Agregação das AgNP na presença do MT imediatamente preparadas e após 3 h de adsorção



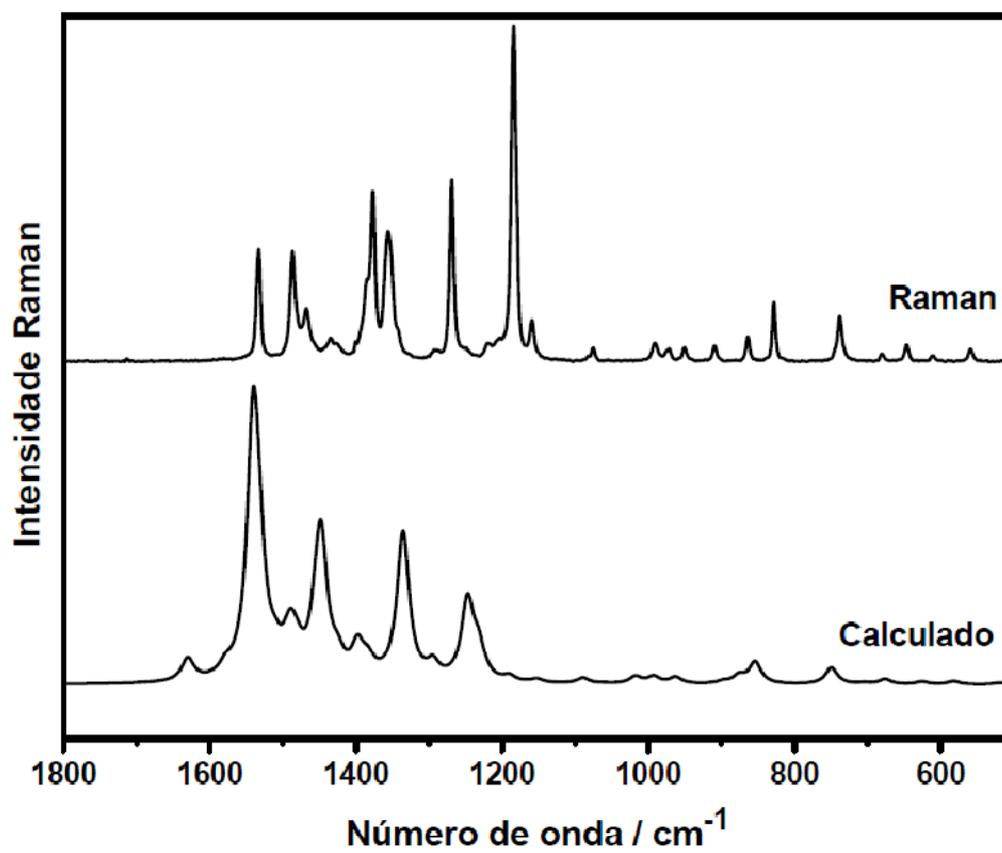
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.5.4.2 Espectro Raman e SERS do MT

A Figura 35 mostra a geometria otimizada do MT através de cálculos DFT. O  $pK_a$  do MT é 2,49 e, assim como no TI, envolve a protonação do nitrogênio 3 do anel imidazólico. Portanto, tanto no estado sólido, quanto em solução em  $pH=6$  a espécie predominante é a espécie neutra (SHALAEVA et al., 2008).



Figura 36: Espectros Raman experimental e teórico do MT



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Tabela 3: Atribuições vibracionais do espectro Raman do MT obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada.

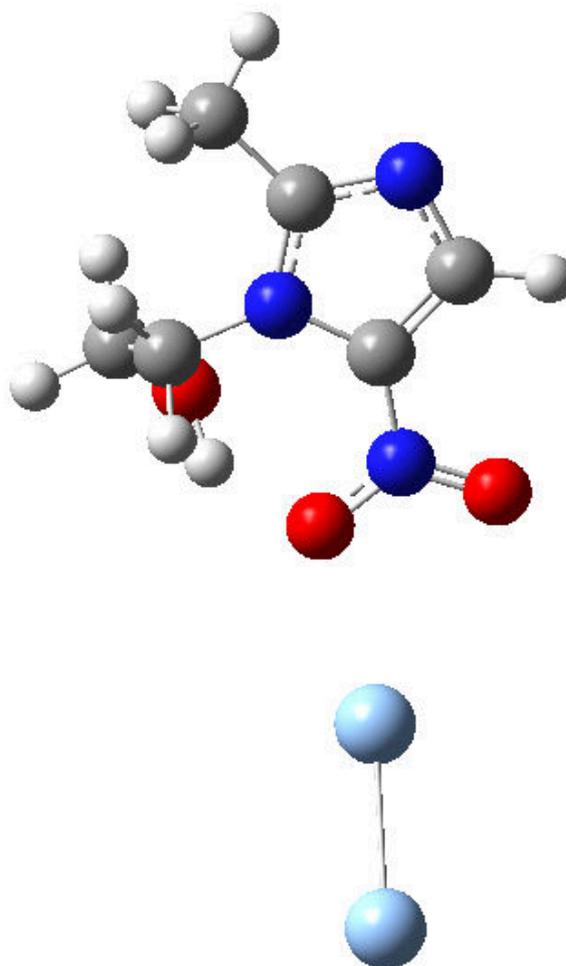
Raman	Teórico	Atribuição
1533	1630	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{ant}}$
1486	1540	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \nu(\text{CC})_{\text{cl}}$
1468	1531	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} +$ $\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
1434	1488	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3) + \nu(\text{C-NO}_2)$
1384	1480	$\nu(\text{C-NO}_2) + \delta(\text{CH}_3)$
1377	1453	$\nu(\text{C-NO}_2) + \nu(\text{CC})_{\text{cl}} +$ $\nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}}$
1355	1447	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}} + \nu(\text{C-NO}_2) +$ $\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \delta(\text{CH}_2)_{\text{sci}}$
1269	1335	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}}$
1183	1247	$\nu(\text{N-C})_{\text{cl}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im}}$
1076	1190	$\nu(\text{C-NO}_2) + \nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}} +$ $\delta(\text{CH})$
829	854	$\delta(\text{NO}_2)_{\text{sci}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im}}$

Legenda: ant – estiramento antissimétrico; im – anel imidazólico; cl – cadeia lateral; sci – tesoura; sim – estiramento simétrico;

As bandas Raman em 1533, 1355 e 829  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas principalmente aos estiramentos antissimétrico, simétrico e deformação angular do grupo nitro, respectivamente. As bandas Raman em 1486, 1468 e 1183  $\text{cm}^{-1}$  tem em sua composição modos que são atribuídos aos estiramentos e deformação angular CC,CN do anel imidazólico.

A Figura 37 mostra o modelo teórico do MT interagindo com 2 átomos de prata, otimizado através de cálculos DFT, e utilizado na atribuição do espectro SERS.

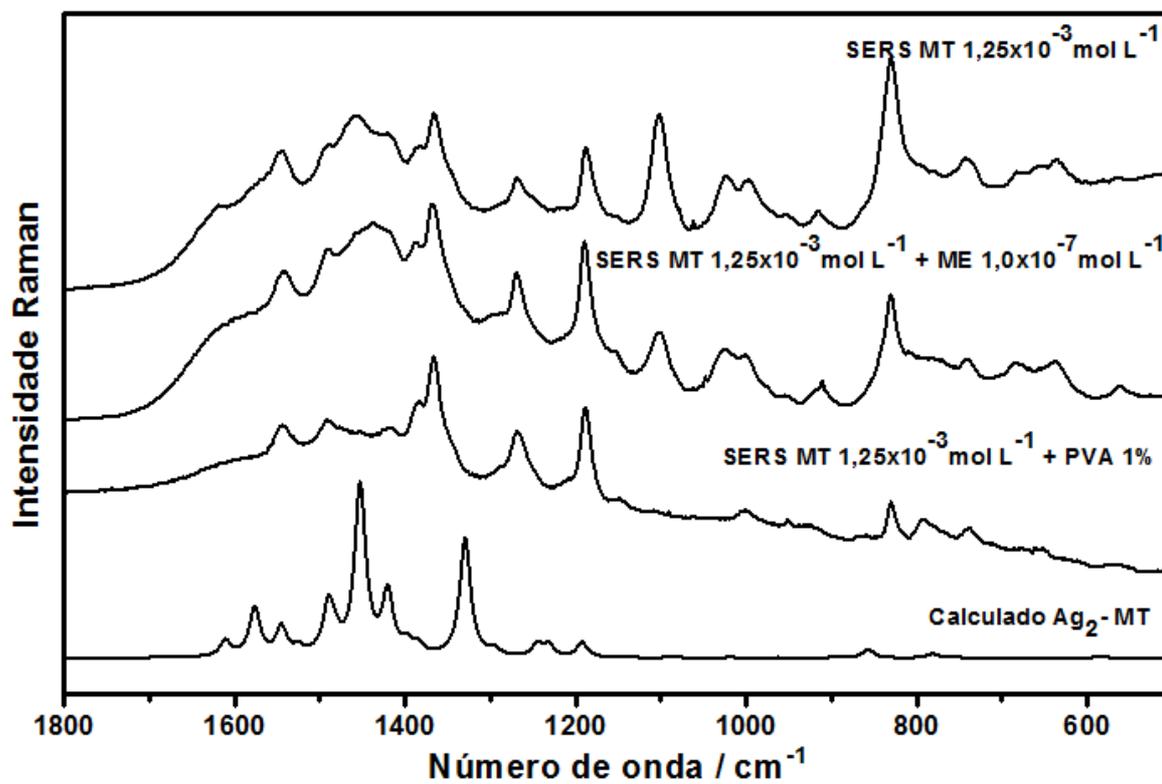
Figura 37: Geometria otimizada do MT interagindo com 2 átomos de prata.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 38 mostra os espectros SERS do MT adsorvido em AgNP, na ausência e na presença dos modificadores de superfície 2-mercaptoetanol e PVA, junto com o espectro Raman calculado para o MT interagindo com 2 átomos de prata. A atribuição vibracional dos espectros SERS é apresentada na Tabela 4.

Figura 38: Espectros SERS do MT na ausência e presença dos modificadores de superfície ME e PVA junto com o espectro Raman calculado para o modelo do complexo de superfície



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Tabela 4: Atribuição vibracional dos espectros SERS do MT adsorvido sobre AgNP na ausência, na presença de 2-mercaptoetanol e PVA obtidas a partir de cálculos teóricos do MT interagindo com 2 átomos de prata.

SERS AgNP	SERS AgNP + ME	SERS AgNP + PVA	MT - Ag Calc.	Atribuição
1620				795+830
1600 <sub>(sh)</sub>				2x795
1544	1541	1544	1611	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{ass}}$
1491	1490	1491	1545	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \nu(\text{CC})_{\text{cl}}$
1457	1457		1525	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
1421	1420		1490	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3) + \nu(\text{C-NO}_2)$
1384	1387	1388	1483	$\nu(\text{C-NO}_2) + \delta(\text{CH}_3)$
1366	1367	1367	1453	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}} + \nu(\text{C-NO}_2) +$ $\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \delta(\text{CH}_2)_{\text{sci}}$
1267	1269	1267	1330	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}}$
1187	1188	1187	1244	$\nu(\text{N-C})_{\text{cl}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im}}$
1100	1106		1192	$\nu(\text{C-NO}_2) + \nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}} + \delta(\text{CH})$
1019	1026		1086	$\delta(\text{CC})_{\text{cl}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im}} +$ $\nu(\text{NO}_2)_{\text{sim}}$
999	1004		1018	$\delta(\text{CC,CN})_{\text{im}} + \delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
830	830	830	856	$\delta(\text{NO}_2)_{\text{sci}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{im}}$
800 <sub>(sh)</sub>		795	782	$\delta(\text{CC,CN})_{\text{oop}} + \delta(\text{CNO}_2)_{\text{oop}}$

ant – estiramento antissimétrico; im – anel imidazólico; cl – cadeia lateral; sci – tesoura; sim – estiramento simétrico; oop – fora do plano.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Na ausência de modificadores de superfície as intensas bandas SERS em 1544, 1366, 1100 e 830  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a modos normais envolvendo as vibrações do grupo nitro permitem sugerir que o grupo nitro está envolvido na interação do MT com a superfície metálica da prata. A presença de um ombro em 795  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída a deformação angular fora do plano do anel imidazólico, sugerem que o plano do anel imidazólico no MT está perpendicular a superfície da prata, enquanto que no TI este anel está em ângulo. Esta hipótese é reforçada pela intensificação das bandas SERS

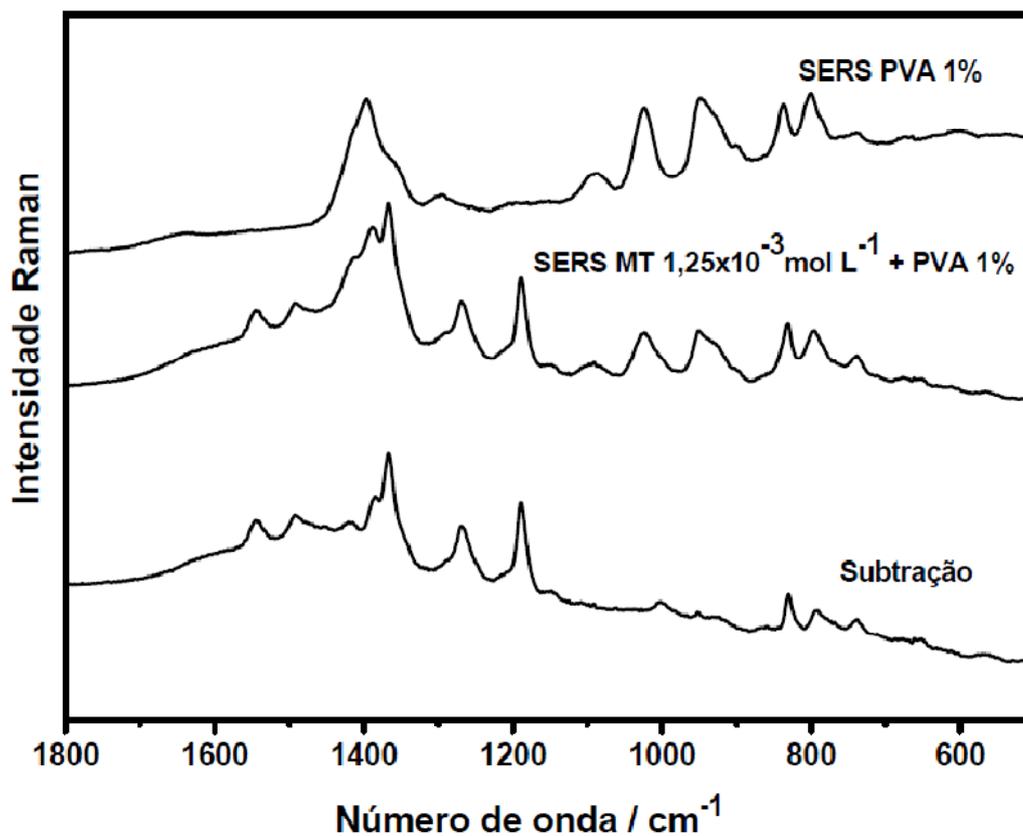
em 1457, 1267 e 1187  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas a modos normais que envolvem as vibrações do anel imidazólico. Como observado para o TI, as bandas SERS em 1620 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas como bandas harmônicas e de combinação das bandas SERS em 795 e 830  $\text{cm}^{-1}$ .

Na presença de 2-mercaptoetanol, o espectro SERS do MT, mostra uma diminuição na intensidade relativa das bandas em 1600, 1544, 1100 e 830  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas as vibrações do imidazol e do grupo nitro. Tais evidências sugerem que o 2-mercaptoetanol opera como um espaçador, interferindo na interação do anel imidazólico com a superfície metálica da prata.

Para o espectro SERS do MT obtido na presença do PVA foi necessário realizar a subtração do espectro do PVA sozinho. Isto foi devido ao fato das bandas SERS do PVA interferirem no espectro SERS do MT adsorvido sobre AgNP A2.3 que são modificadas com PVA. Na Figura 39 está representado o espectro SERS do PVA, o espectro SERS do MT adsorvido nas AgNP A2.3 e a subtração dos espectros. Esta subtração foi eficiente, uma vez que as bandas SERS atribuídas ao PVA mostraram uma baixa intensidade relativa.

Na presença do PVA, a diminuição na intensidade relativa das bandas em 1620, 1600, 1100 e 830  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas as vibrações do grupo nitro e a intensificação da banda SERS em 795  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída as vibrações do anel imidazólico fora do plano, são mais pronunciadas. Quando o PVA atua como modificador de superfície, a molécula está mais distante da superfície da prata e seu padrão espectral se aproxima do espectro Raman do MT no estado sólido.

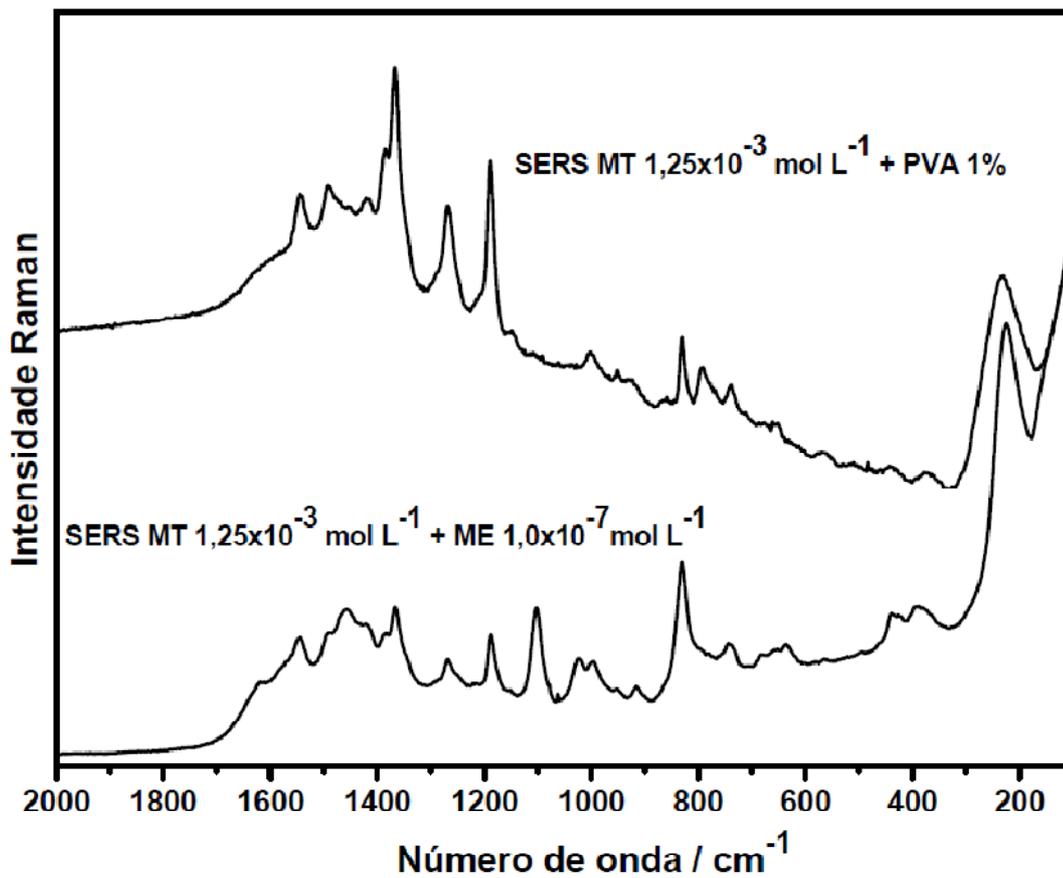
Figura 39: Espectros SERS do PVA 1%, do MT adsorvido sobre AgNP modificadas com PVA e subtração dos espectros.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 40 mostra os mesmos espectros das Figuras 37 e 38, incluindo a faixa de números de onda 100-2000  $\text{cm}^{-1}$ . Como se pode observar há um fundo SERS, o qual é devido a ressonância da banda LSPR em c.a. 600 nm do coloide A2.3 e a radiação excitante utilizada. A banda SERS em c.a. 220  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento Ag-Ag é também uma característica do espectro SERS.

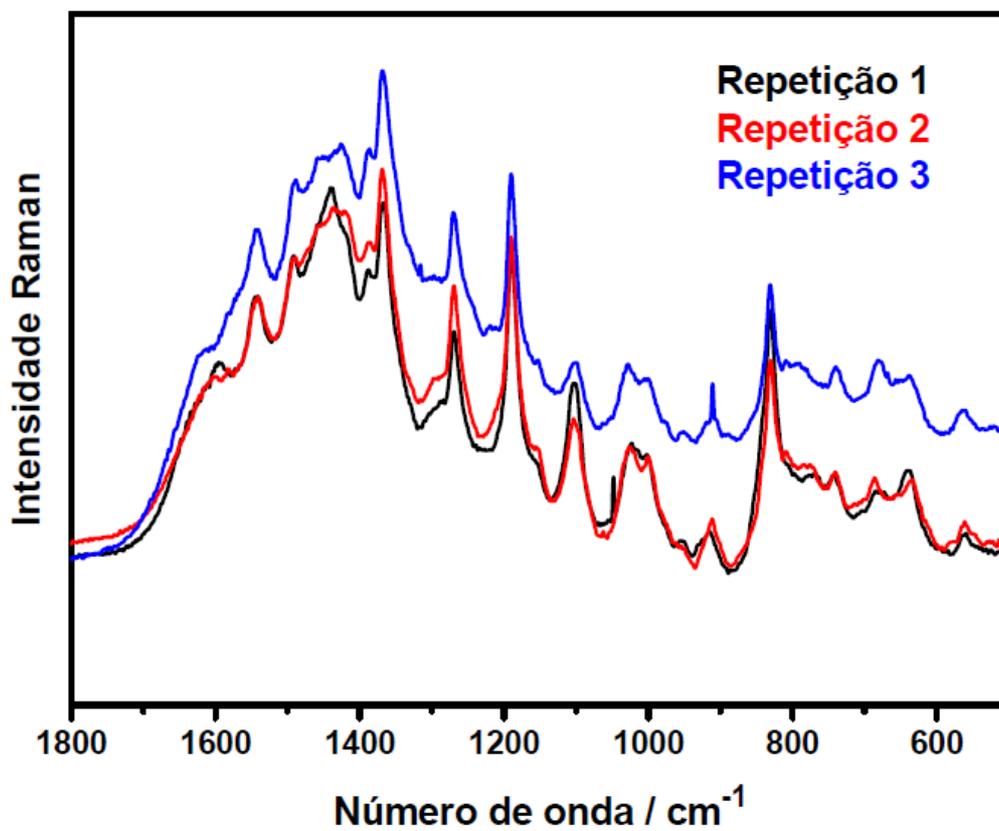
Figura 40: Espectros SERS do MT adsorvido em AgNP modificadas quimicamente com PVA e ME na faixa de 100-2000  $\text{cm}^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Da mesma forma como no TI foi realizado o estudo da reprodutibilidade dos espectros SERS do MT em diferentes dias. A Figura 41 mostra os espectros SERS do MT obtidos em diferentes com intervalo de 1 semana.

Figura 41: Estudo da reprodutibilidade dos espectros SERS do MT.



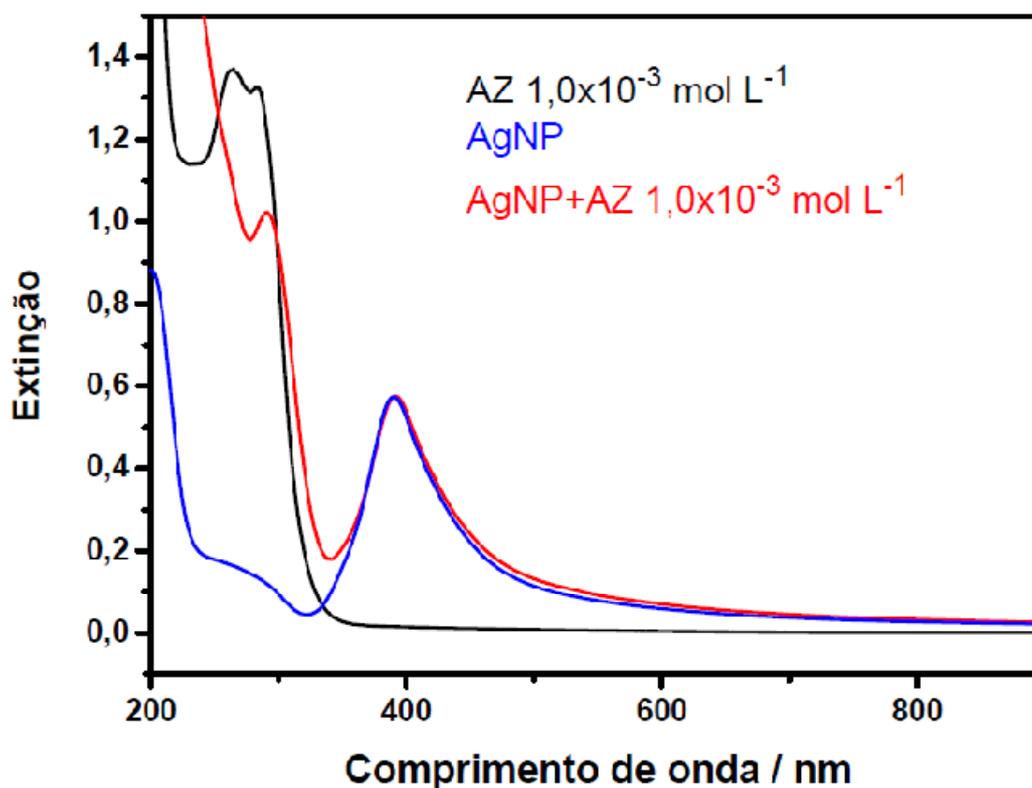
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

#### 4.5.5. Aztreonam (AZ)

##### 4.5.5.1. Espectros de extinção das AgNP na presença e ausência do AZ

A Figura 42 mostra os espectros UV-VIS da solução de AZ e da suspensão de AgNP na ausência e presença do AZ. A adição do AZ sobre as AgNP, imediatamente preparadas, não provoca deslocamentos do máximo de extinção da suspensão de AgNP, preservando o formato da banda de extinção das AgNP, o que indica que não há agregação da suspensão de AgNP na presença do AZ.

Figura 42: Análise da adsorção do AZ em AgNP por espectroscopia UV-VIS

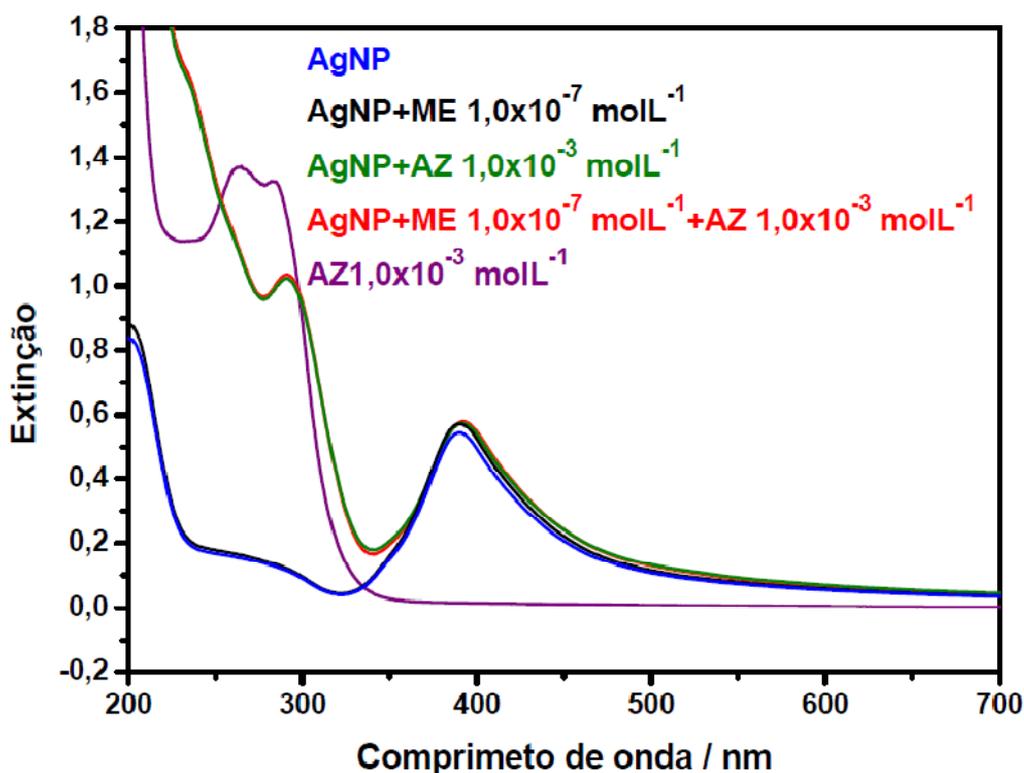


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Novamente, a presença do 2-mercaptoetanol na concentração de submonocamada ( $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ) não provocou agregação das AgNP.

A Figura 43 mostra os espectros UV-VIS da solução de AZ e da suspensão de AgNP modificadas quimicamente ou não com 2-mercaptoetanol obtidos na ausência e na presença do AZ.

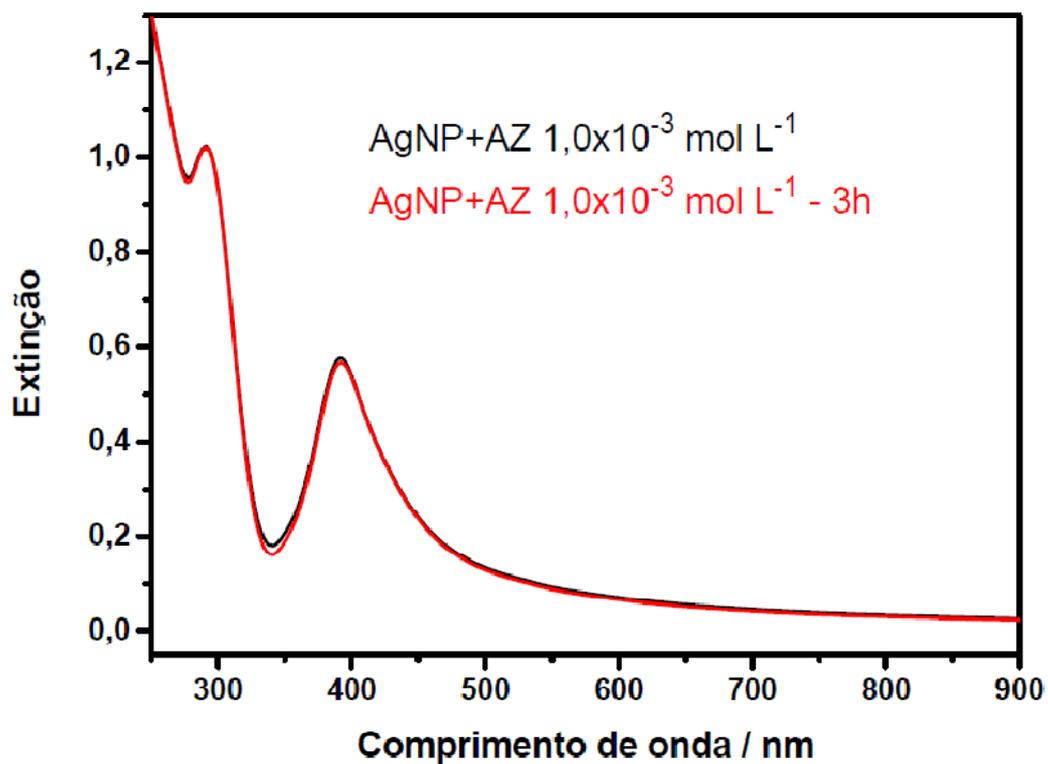
Figura 43: Análise da adsorção do AZ em AgNP modificadas ou não por 2-mercaptoetanol por espectroscopia UV-VIS



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Após 3 h de adsorção do AZ sobre a superfície das AgNP ocorreu um pequeno deslocamento do máximo de extinção de 390 para 393 nm, o que indica que o processo de agregação das AgNP na presença do AZ é bem mais lento que o observado para o TI e o MT. A Figura 44 mostra os espectros de extinção das AgNP e das AgNP na presença do AZ após 3 h de interação.

Figura 44: Agregação das AgNP na presença do AZ imediatamente preparadas e após 3 h de adsorção

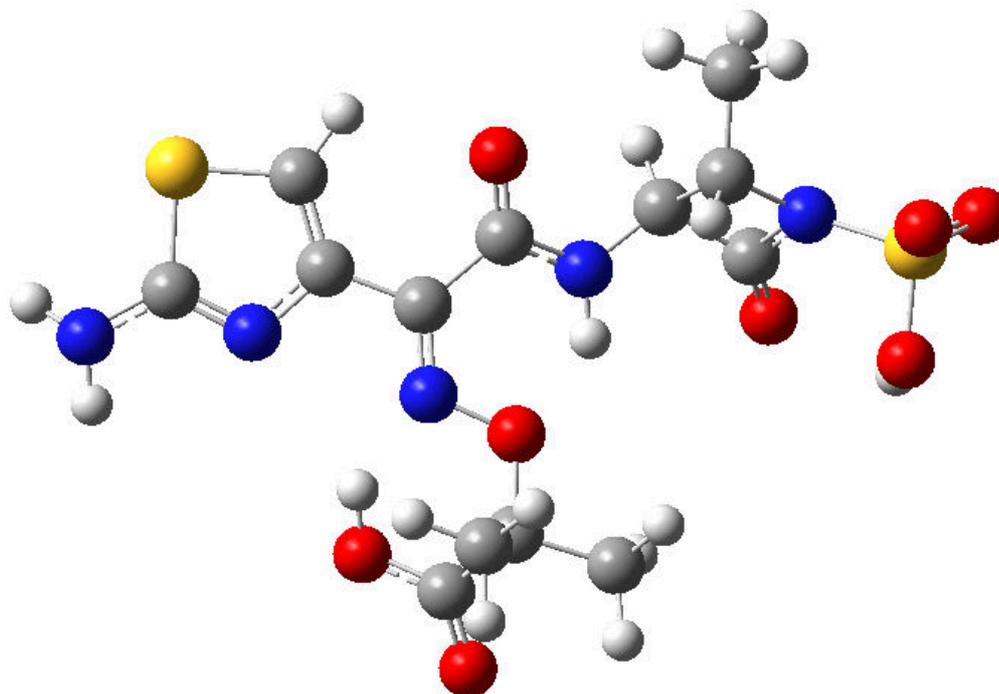


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.5.5.2 Espectro Raman e SERS do AZ

A Figura 45 mostra a geometria otimizada do AZ através de cálculos DFT. O AZ possui 3 valores de  $pK_a$  -0,7, 2,75 e 3,91, os quais envolvem a protonação dos grupos sulfonil, carboxil e a amina primária. Portanto, em solução aquosa em pH neutro, a espécie predominante é o diânion  $AZ^{2-}$ .

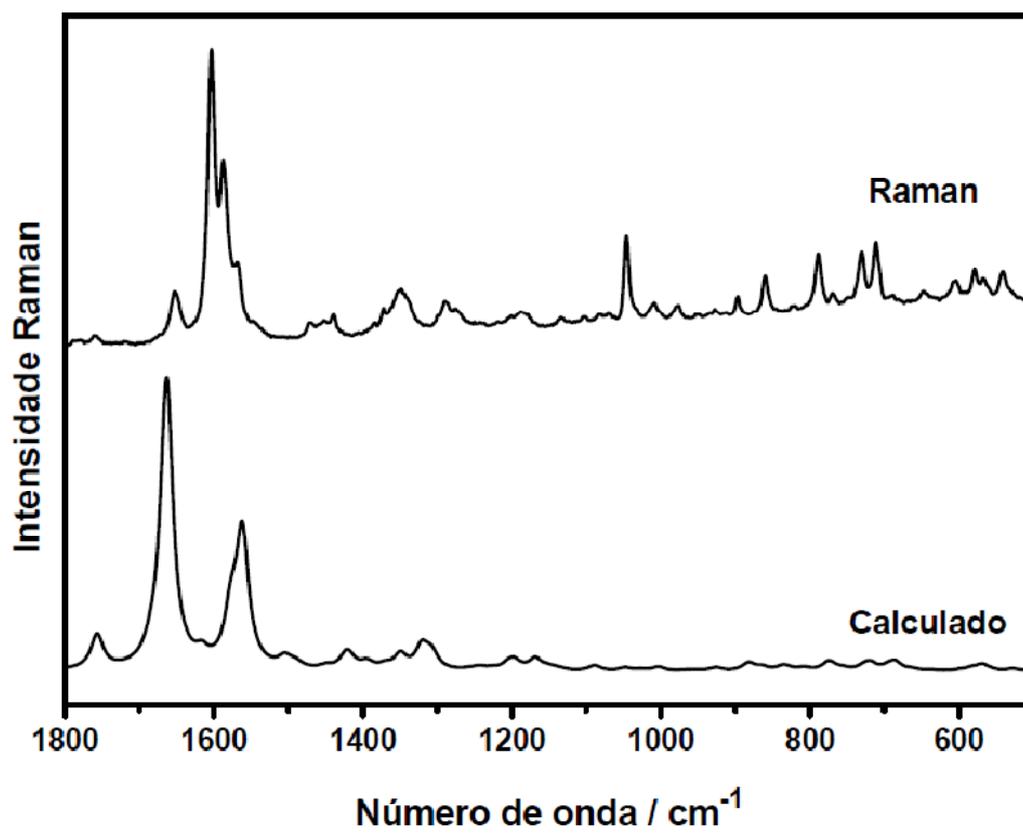
Figura 45: Geometria otimizada do AZ



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 46 mostra o espectro Raman do AZ junto com o espectro Raman calculado. A Tabela 5 mostra a atribuição vibracional do espectro Raman do AZ.

Figura 46: Espectros Raman experimental e teórico do AZ



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 5: Atribuições vibracionais do espectro Raman do AZ obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada.

Raman	Teórico	Atribuição
1785	1874	$\nu(\text{CO})_{\beta}$
1763	1853	$\nu(\text{CO})_{\text{carb}}$
1653	1757	$\nu(\text{CO})_{\text{am}}$
1603	1663	$\nu(\text{CN})_{\text{ox}} + (\text{CC})_{\text{ti}}$
1585	1616	$\nu(\text{CN})_{\text{ti}} + \nu(\text{CN})_{\text{am}} + \delta(\text{NH}_2)$
1572	1577	$\nu(\text{CC})_{\text{ti}} + \nu(\text{CN})_{\text{am}}$
1548	1562	$\nu(\text{CC})_{\text{ti}} + \nu(\text{CN})_{\text{am}}$
1475	1505	$\delta(\text{CH}_3)$
1459	1490	$\delta(\text{CH}_3)$
1372	1423	$\nu(\text{CN})_{\text{ti}} + \nu(\text{CC})_{\text{am}} + \nu(\text{CC})_{\beta}$
1350	1393	$\delta(\text{CH}_3) + \delta(\text{CH})$
1047	1089	$\nu(\text{NO})_{\text{ox}} + \nu(\text{CN})_{\text{ti}}$
729		$\delta(\text{CNS})_{\text{ti,oop}} + \delta(\text{CC,CN})_{\beta}$
711	718	$\delta(\text{CNS})_{\text{ti,oop}}$

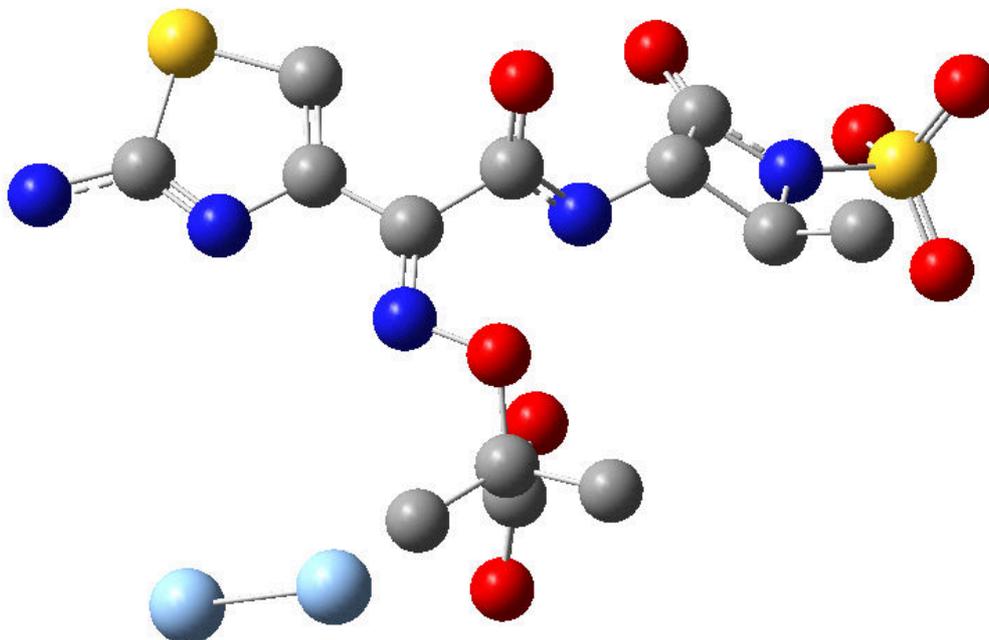
$\nu$ : estiramento;  $\delta$ : deformação angular; ti:anel tiazólico; am: amida;  $\beta$ : anel  $\beta$ -lactâmico; sim: estiramento simétrico; ant: estiramento antissimétrico; carb: ácido carboxílico; oop: fora do plano; ox: oxima protegida; sh: ombro.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O espectro Raman do AZ mostra uma banda em  $1763 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento da carbonila do ácido carboxílico, o que nos permite inferir que este sítio está protonado no estado sólido.

A Figura 47 mostra o modelo teórico do  $\text{AZ}^{2-}$  interagindo com 2 átomos de prata, otimizado através de cálculos DFT, e utilizado na atribuição do espectro SERS.

Figura 47: Geometria otimizada do  $AZ^{2-}$  interagindo com 2 átomos de prata.

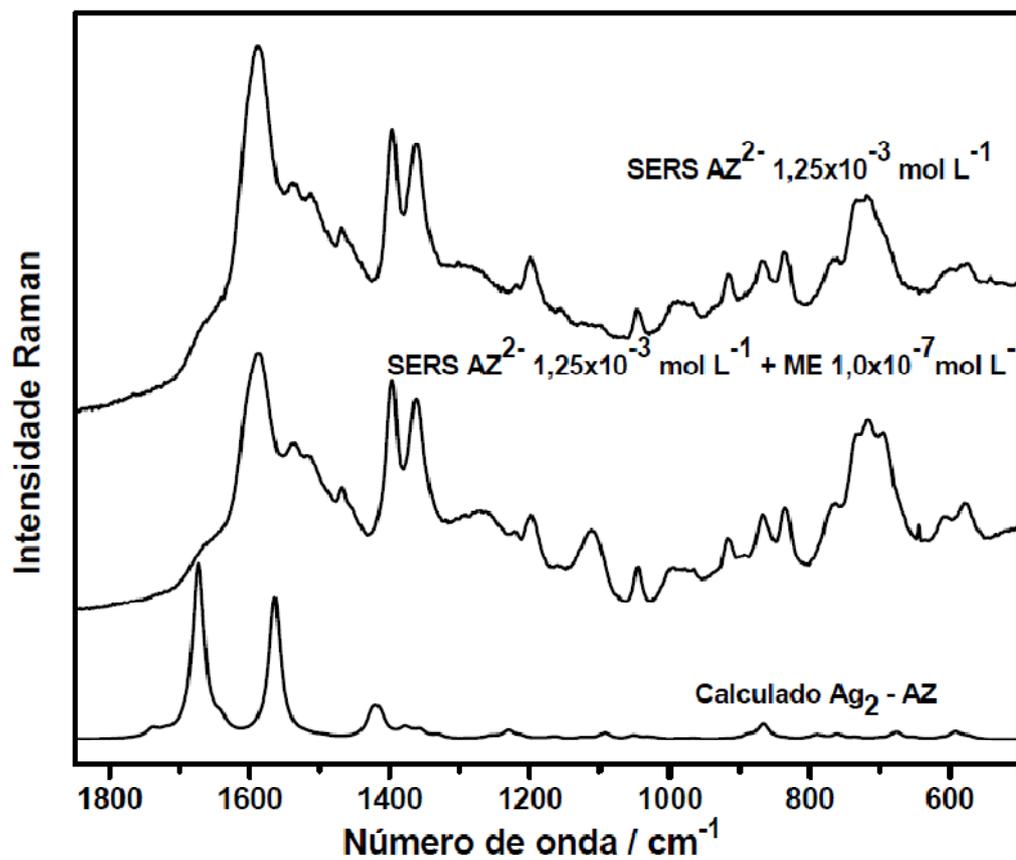


Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização da geometria

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

A Figura 48 mostra os espectros SERS do  $AZ^{2-}$  adsorvido em AgNP, na ausência e na presença do modificador de superfície 2-mercaptoetanol, junto com o espectro Raman calculado para o  $AZ^{2-}$  interagindo com 2 átomos de prata. A atribuição vibracional dos espectros SERS é apresentada na Tabela 6

Figura 48: Espectros SERS do  $AZ^{2-}$  na ausência e presença do modificador de superfície ME junto com o espectro Raman calculado para o modelo do complexo de superfície



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Tabela 6: Atribuição vibracional dos espectros SERS do  $AZ^{2-}$  adsorvido sobre AgNP na ausência e na presença de 2-mercaptoetanol obtidas a partir de cálculos teóricos do  $AZ^{2-}$  interagindo com 2 átomos de prata.

SERS AgNPs	SERS AgNPs + ME	$AZ^{2-}$ -Ag (Calc.)	Atribuição
1648 <sub>(sh)</sub>	1649 <sub>(sh)</sub>	1738	$\nu(CO)_{am} + \nu(COO^-)_{ant}$
1612 <sub>(sh)</sub>	1609 <sub>(sh)</sub>	1720	$\nu(COO^-)_{ant} + \nu(CO)_{am}$
1600 <sub>(sh)</sub>	1600 <sub>(sh)</sub>	1673	$\nu(CN)_{ox} + (CC)_{ti}$
1585	1585	1642	$\nu(CN)_{ti} + \nu(CN)_{am} + \delta(NH_2)$
1565 <sub>(sh)</sub>	1565 <sub>(sh)</sub>	1637	$\nu(CC)_{ti} + \nu(CN)_{am}$
1538	1539	1564	$\nu(CC)_{ti} + \nu(CN)_{am}$
1512	1512	1521	$\delta(CH_3) + \nu(COO^-)$
1465	1465	1521	$\delta(CH_3)$
-	-	1498	$\delta(CH_3)$
1397	1396	1425	$\nu(CN)_{ti} + \nu(CC)_{am} + \nu(CC)_{\beta}$
1359	1360	1414	$\nu(COO^-)_{sim}$
1196	1197	1212	$\nu(CS, CN)_{ti} + \nu(CN)_{am} + \nu(CN)_{\beta}$
	1114	1163	$\nu(CC, CN)_{ti}$
1045	1044	1093	$\nu(NO)_{ox} + \nu(CN)_{ti}$
730	733	761	$\delta(CNS)_{ti,oop} + \delta(CC, CN)_{\beta}$
718	718	734	$\delta(CNS)_{ti,oop}$
	691	701	$\delta(CNC)_{ti,oop}$
	675	676	$\delta(CNS)_{ti,oop}$

$\nu$ : estiramento;  $\delta$ : deformação angular; ti:anel tiazólico; am: amida;  $\beta$ : anel  $\beta$ -lactâmico; sim: estiramento simétrico; ant: estiramento antissimétrico; carb: ácido carboxílico; oop: fora do plano; ox: oxima protegida; sh: ombro.

Nos espectros SERS, a observação de um ombro em  $1648\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento CO da amida e as vibrações do carboxilato, sugerem que a espécie desprotonada  $AZ^{2-}$  é a predominante na superfície das AgNP, sendo esta também a espécie predominante em solução. Esta hipótese é reforçada pela presença das bandas SERS em  $1512$  e  $1359\text{ cm}^{-1}$ , que também possuem contribuição dos estiramentos do carboxilato, e são ausentes no espectro Raman do AZ no estado sólido.

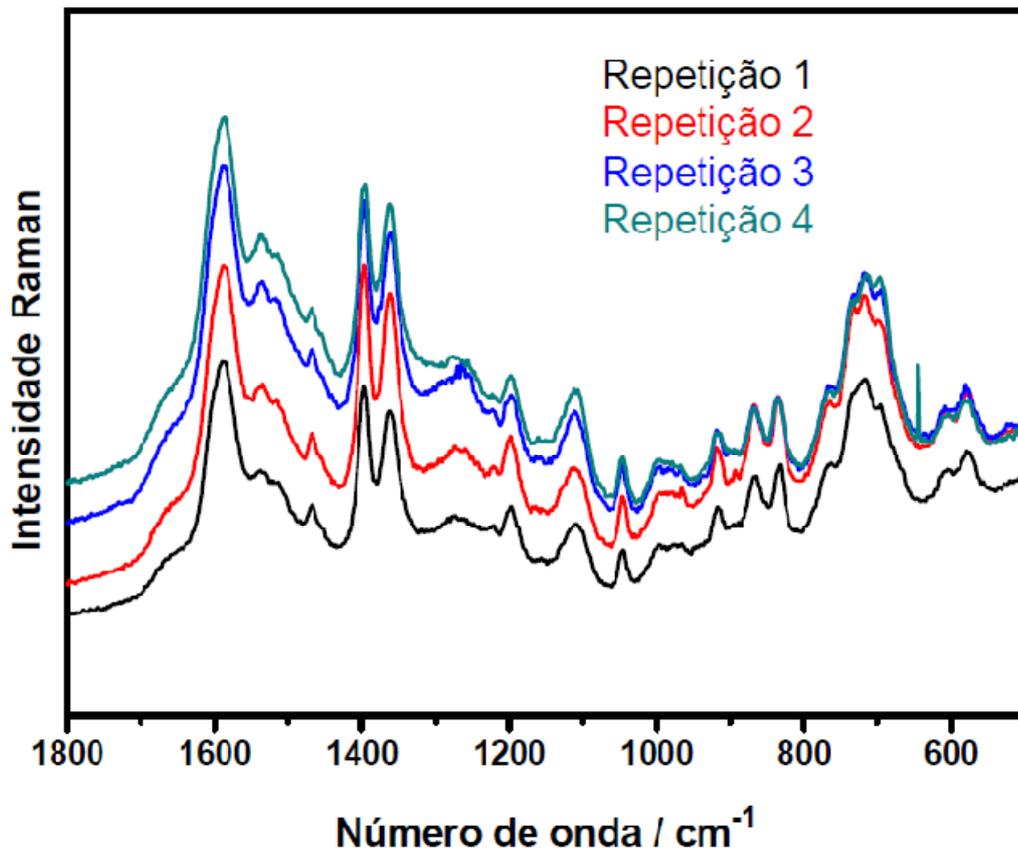
As intensificações dessas bandas que são características de vibrações do carboxilato permitem concluir que o carboxilato é um possível sítio de adsorção do AZ sobre a superfície metálica da prata. As intensas bandas SERS em  $1588$ ,  $1565$  (sh),  $1538$  e  $1397\text{ cm}^{-1}$  que são atribuídas a modos normais que envolvem preferencialmente os estiramentos CC,CN do anel tiazólico, sugerem que este anel também está envolvido na interação com a superfície metálica da prata.

Na presença do 2-mercaptoetanol, o espectro SERS do AZ mostra uma diminuição na intensidade relativa da banda em  $1585\text{ cm}^{-1}$  e uma intensificação da

banda em  $1114\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento CC, CN do anel tiazólico, e também uma intensificação das bandas em  $733, 718, 691$  e  $675\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas principalmente as deformações angulares do anel tiazólico fora do plano. Tais diferenças espectrais permitem sugerir que as ligações de hidrogênio entre  $AZ^{2-}$  e o 2-mercaptoetanol leva a uma geometria de adsorção do anel tiazólico mais planar em relação a superfície metálica da prata. No entanto, a alta intensidade das bandas atribuídas as vibrações do carboxilato permitem inferir que este grupo é preservado como sítio de adsorção.

Foi realizado, ainda o estudo da reprodutibilidade dos espectros SERS do AZ na presença de 2-mercaptoetanol em diferentes dias. A Figura 49 mostra os espectros SERS do AZ obtidos em diferentes dias.

Figura 49: Estudo da reprodutibilidade dos espectros SERS do AZ.



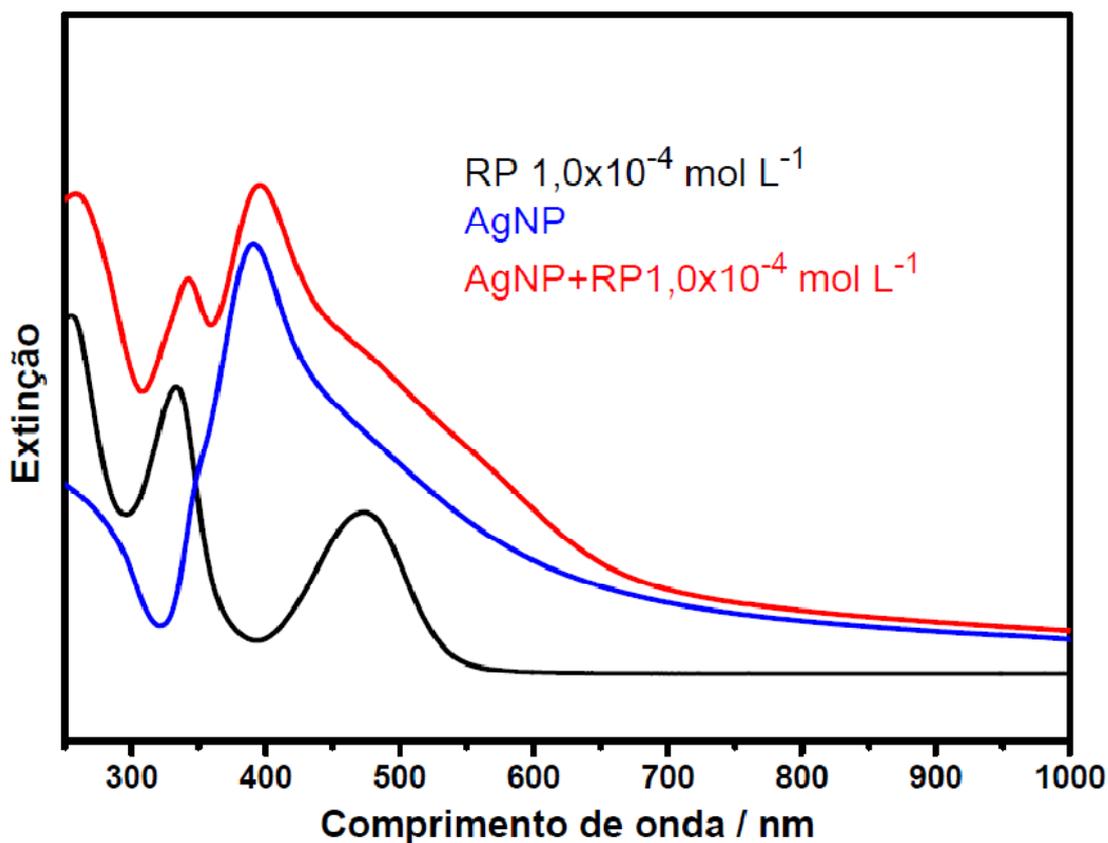
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

#### 4.5.6. Rifampicina (RP)

##### 4.5.6.1 Espectros de extinção das AgNP na presença e ausência da RP

A Figura 50 mostra os espectros UV-VIS da solução de RP e da suspensão de AgNP na ausência e presença da RP. Como podemos observar, a banda LSPR das AgNP apresenta um máximo de extinção centrado em 390 nm e um alargamento da banda que se estende desde a região do vermelho até o infravermelho próximo que pode ser atribuída a larga distribuição de tamanhos das AgNP. A adsorção da RP sobre a superfície das AgNP levou a um aumento da extinção entre 500 e 650 nm, que pode ser atribuída a formação de pequenos agregados de AgNP formados pela mudança no equilíbrio de carga da superfície metálica. Tais agregados apresentam propriedades plasmônicas adequadas para se obter os espectros SERS com excitação na região do visível.

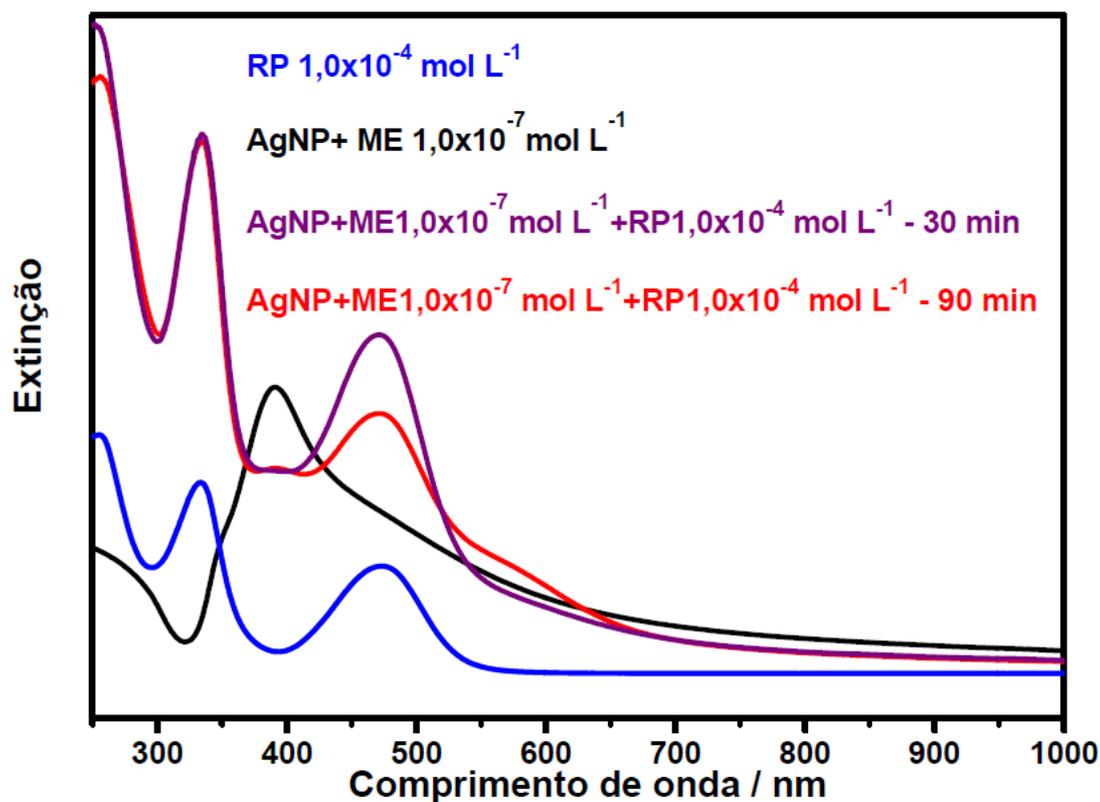
Figura 50: Análise da adsorção da RP em AgNP por espectroscopia UV-VIS



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A Figura 51 apresenta o espectro UV-VIS da solução de RP e os espectros de extinção das AgNP na presença do 2-mercaptoetanol e na ausência e presença da RP. A adsorção do 2-mercaptoetanol na superfície das AgNP, em concentração de submonocamada não provoca alterações significativas na banda LSPR do colóide de prata. No entanto, a interação com a RP após 90 min de adsorção promoveu a agregação das AgNP com o surgimento de uma nova banda em *ca.* 570 nm.

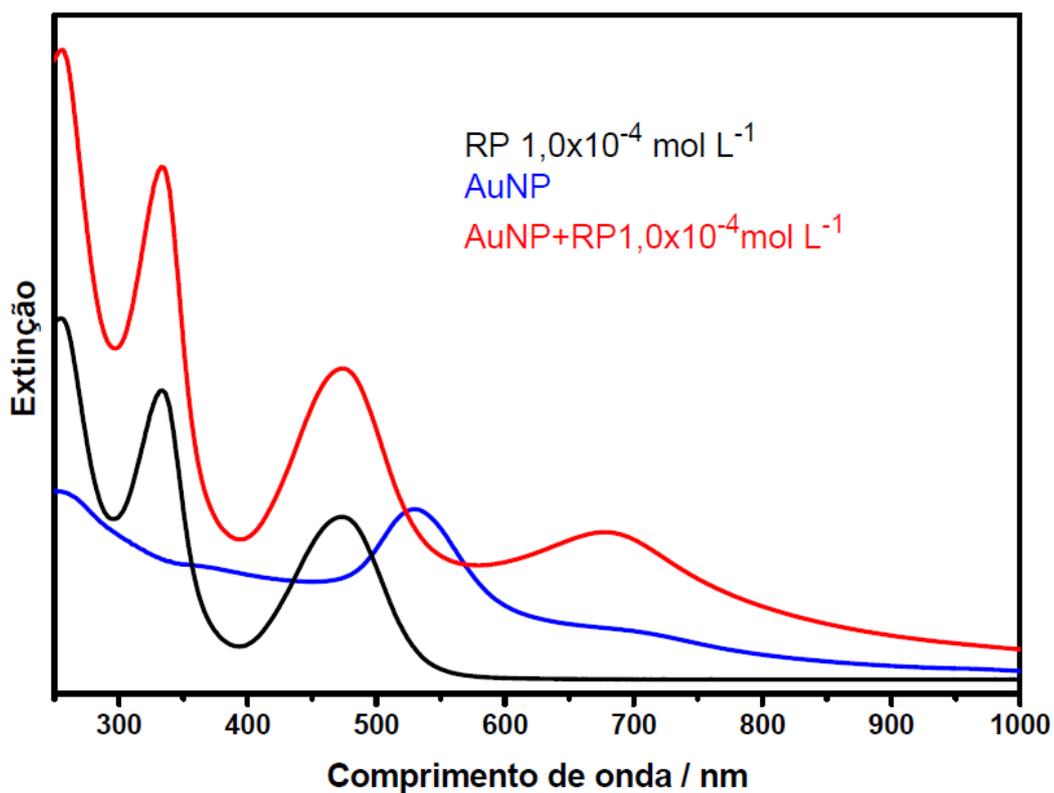
Figura 51: Análise da adsorção da RP em AgNP modificadas por 2-mercaptoetanol por espectroscopia UV-VIS



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 52 apresenta os espectros UV-VIS da solução de RP e da suspensão de AuNP na ausência e na presença da RP. O espectro de extinção das AuNP apresentam um máximo da banda LSPR em 530 nm, com um ombro largo que se estende para a região do infravermelho próximo, a qual pode ser atribuída a larga distribuição de tamanhos das AuNP. A adsorção da RP sobre as AuNP promove um deslocamento para o vermelho da banda LSPR que é responsável pela obtenção dos espectros SERS utilizando radiação excitante em 633 e 1064 nm.

Figura 52: Análise da adsorção da RP em AuNP por espectroscopia UV-VIS

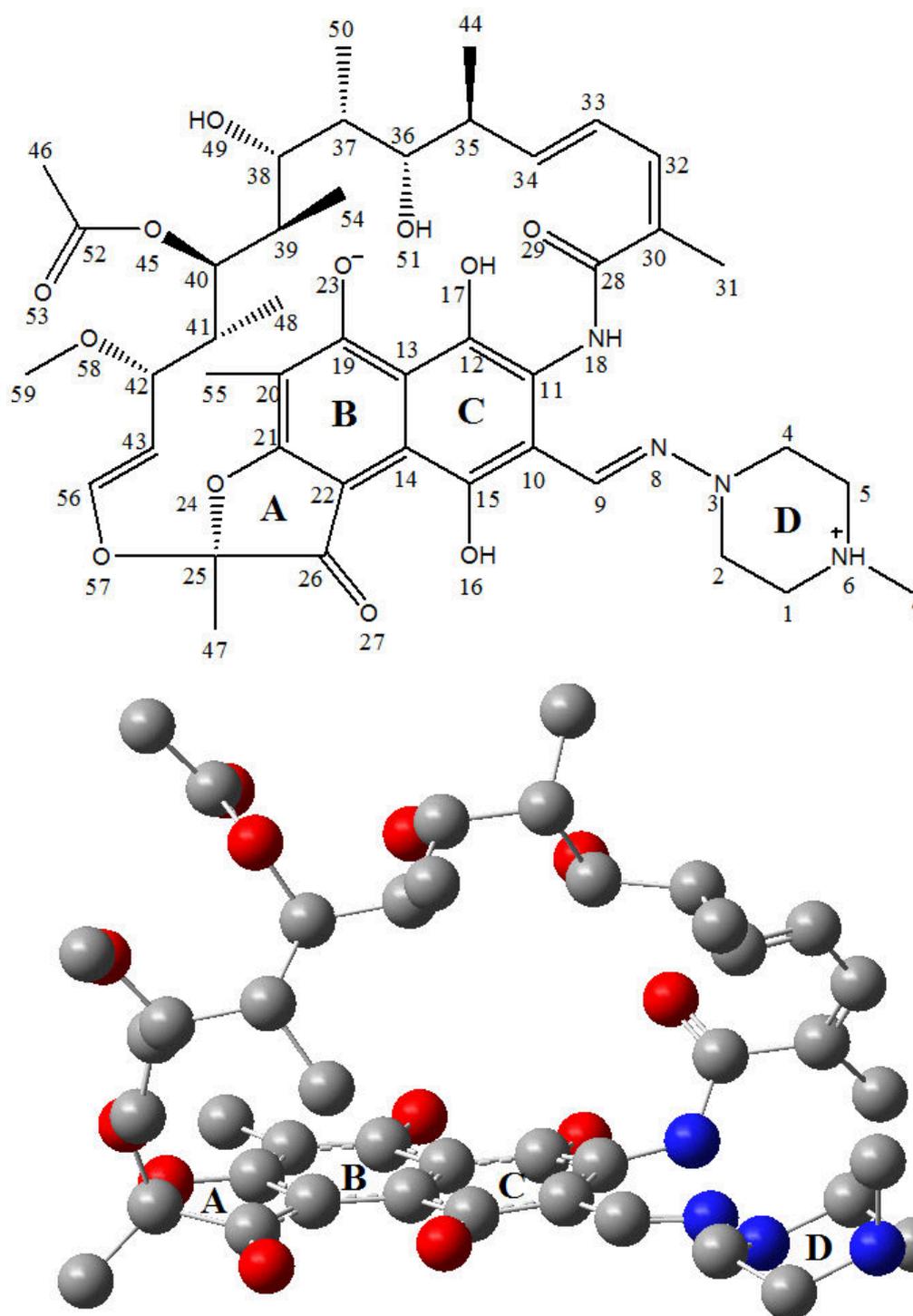


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.5.6.2. Espectro Raman e SERS da RP

A Figura 53 mostra a geometria otimizada da RP através de cálculos DFT, junto com os rótulos dos átomos que foram utilizados para a atribuição dos espectros Raman e SERS. A RP possui 2 valores de  $pK_a$  1,7 e 7,9, os quais envolvem a protonação dos grupos hidroxila ( $O^{23}H$ ) e do nitrogênio da piperazina ( $N^6H$ ). Portanto, em solução aquosa em pH neutro, a espécie predominante é a zwitteriônica.

Figura 53: Geometria otimizada da RP, e fórmula estrutural com os rótulos dos átomos

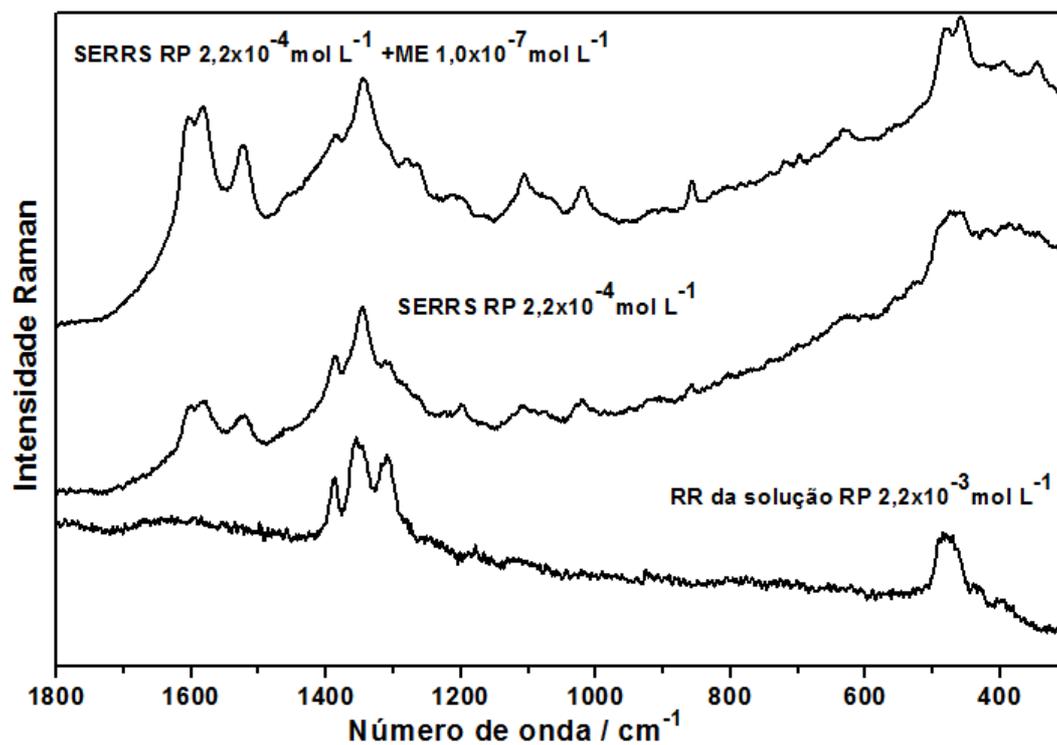


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 54 mostra os espectros Raman ressonante e SERRS da RP adsorvida em superfície de prata obtida na ausência e presença do modificador de superfície 2-

mercaptoetanol, utilizando radiação excitante de comprimento de onda em 532 nm. A atribuição vibracional dos espectros SERRS e SERS da RP obtidos na presença dos modificadores de superfície 2-mercaptoetanol e ácido clorídrico é apresentada na Tabela 7.

Figura 54: Espectros Raman ressoante e SERRS da RP adsorvida em AgNP na ausência e presença do ME  $\lambda_0=532$  nm



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Tabela 7: Atribuição vibracional dos espectros SERS da RP na presença dos modificadores de superfície 2-mercaptoetanol ou cloreto de potássio

SERS AuNPs+ ME (1064 nm)	SERS AuNPs + ME (632.8 nm)	SERS AgNPs + ME (632.8 nm)	SERS AgNPs + KCl (632.8 nm)	SERRS AgNPs + ME (532nm)	Atribuição
1635	-	1645	-	-	$\nu(\text{C}^{26}\text{O}^{27})$
	1612		1620	1605	$\nu(\text{C}^{30}\text{C}^{32}) + \nu(\text{C}^{33}\text{C}^{34})$
1584	1582	1590(?)	1589	1584	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}} + \nu(\text{C}^9\text{N}^8) + \nu(\text{C}^{26}\text{O}^{27})$
1557	1540	1554	1548	1523	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}}$
1456	1450 (sh)	-	-	1454	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}} + \nu(\text{C}^{12}\text{O}^{17})$
1440	-	1435	1429	-	$\nu(\text{C}^9\text{N}^8) + \nu(\text{CC})_{\text{B,C}}$
1384	1391	-	1382	1387	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{D}} + \nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}}$
1360	-	1362	-	1368(sh)	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{D}} + \nu(\text{N}^3\text{N}^8)$
1340	1331	1332	1341	1346	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}}$
1312	-	1310	-	1312	$\nu(\text{N}^3\text{N}^8) + \delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
1287	-	-	-	1304	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}} + \nu(\text{C}^{25}\text{C}^{47})$
1264 (sh)	-	1265	1270	1262	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B}} + \nu(\text{C}^{19}\text{O}^{23}) + \nu(\text{C}^{20}\text{C}^{55})$
-	-	-	-	-	$\nu(\text{C}^{41}\text{C}^{42}) + \delta(\text{CH})$
1233	1210	1209	1195	1200	$\nu(\text{N}^3\text{N}^8) + \nu(\text{C}^{28}\text{N}^{18})$
-	-	1170	1170	-	$\nu(\text{C}^{25}\text{O}^{57}) + \nu(\text{C}^{43}\text{C}^{42}\text{O}^{58})$
-	-	-	-	1107	$\nu(\text{N}^3\text{N}^8\text{C}^9\text{C}^{10}) + \nu(\text{CC})_{\text{C}}$
1009	-	1010	1012	1018	$\nu(\text{CC,CO,CN})_{\text{A,B,C,D}} + \nu(\text{C}^{25}\text{O}^{57})$
765	758	-	-	-	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C,oop}} + \nu(\text{CC,CO,CN})_{\text{A,D}}$
628	-	-	-	631	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C,oop}} + \delta(\text{CC,CN})_{\text{D}} + \delta(\text{C}^{31}\text{C}^{30}\text{C}^{32})$
490	-	-	-	-	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C,oop}} + \delta(\text{CC})_{\text{skl}}$
-	-	475	464	480	$\nu(\text{CC})_{\text{C}} + \delta(\text{CC})_{\text{skl}}$
-	-	-	-	-	$\delta(\text{CC,CN})_{\text{D}} + \delta(\text{C}^{15}\text{O}^{16})$
-	458	-	-	458	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C,oop}} + \delta(\text{CC})_{\text{skl}}$
402	-	400	-	-	$\delta(\text{CC})_{\text{C,oop}} + \delta(\text{CC})_{\text{skl}}$
355	-	355	359	344	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C,oop}} + \delta(\text{N}^3\text{N}^8)$

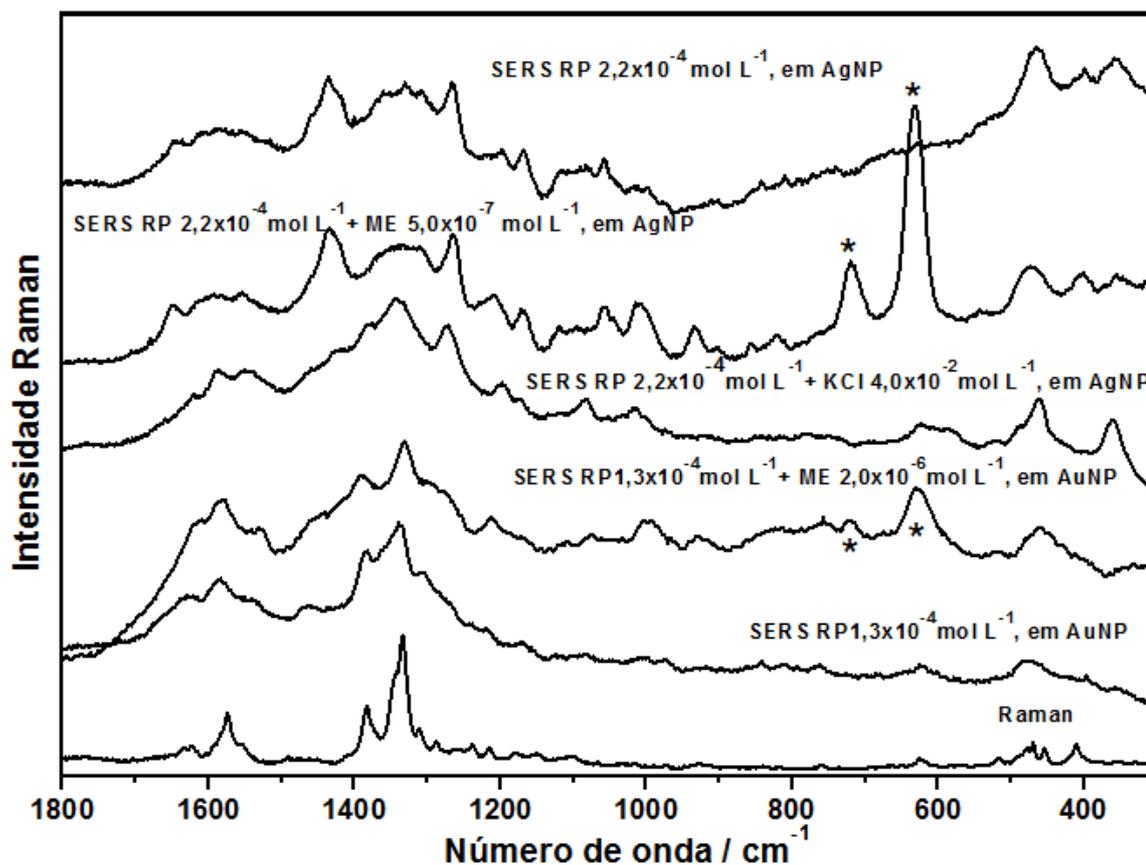
$\delta$  - deformação angular;  $\nu$  - estiramento; oop – fora do plano; skl – esqueleto; sh – ombro;

As intensidades relativas das bandas SERS nas regiões espectrais em 1400-1300  $\text{cm}^{-1}$  e 1630-1500  $\text{cm}^{-1}$  são diferentes nos espectros SERS na ausência e presença do 2-mercaptoetanol. Quando comparamos com o espectro Raman ressonante estas mudanças são mais relevantes na presença do 2-mercaptoetanol. As bandas SERRS em 1523, 1584 e 1605  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos estiramentos CC dos anéis A,B e C e aos estiramentos  $\text{C}^{30}\text{C}^{32}$  e  $\text{C}^9\text{N}^8$ . Estas mudanças podem ser explicadas pelo fato do 2-mercaptoetanol promover uma maior interação da RP com a superfície metálica, levando a mudanças significativas na estrutura eletrônica do sistema  $\pi$  conjugado (grupo cromóforo). Logo, o 2-mercaptoetanol, modifica a interação da RP com a

superfície metálica da prata de forma a se diminuir a importância do efeito Raman ressonante. As bandas SERRS em 344, 458 e 631  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas aos modos normais que tem contribuição de deformação angular CC dos anéis A, B e C fora do plano estão intensificadas. Esta intensificação é devida ao fato destes anéis não estarem perpendiculares em relação a superfície metálica da prata, o que está de acordo com as regras de seleção de superfície (MOSKOVITS, 1982; MOSKOVITS; SUH, 1984).

A Figura 55 mostra os espectros Raman e SERS da RP adsorvida em superfície de ouro e prata obtidos na ausência e presença do modificador de superfície ME, utilizando radiação excitante de comprimento de onda em 633 nm.

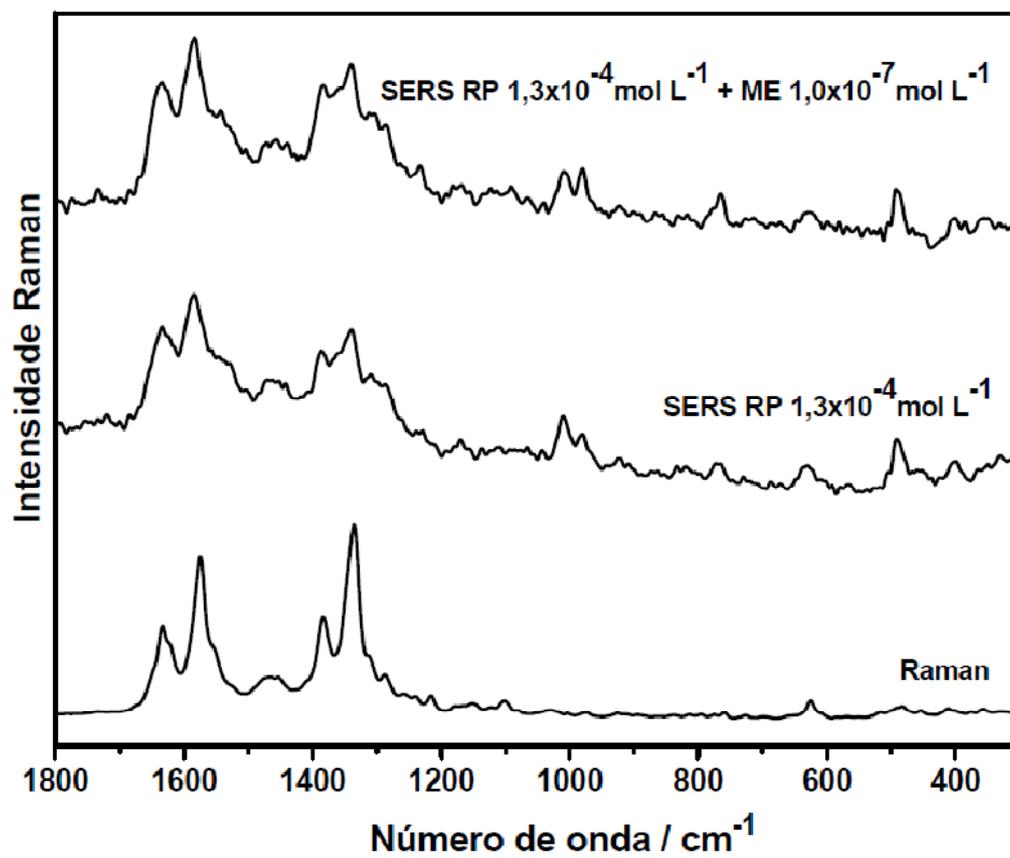
Figura 55: Espectro Raman pré ressonante e SERS da RP adsorvida em AgNP ou AuNP modificadas ou não por ME e HCl.  $\lambda_0 = 633 \text{ nm}$



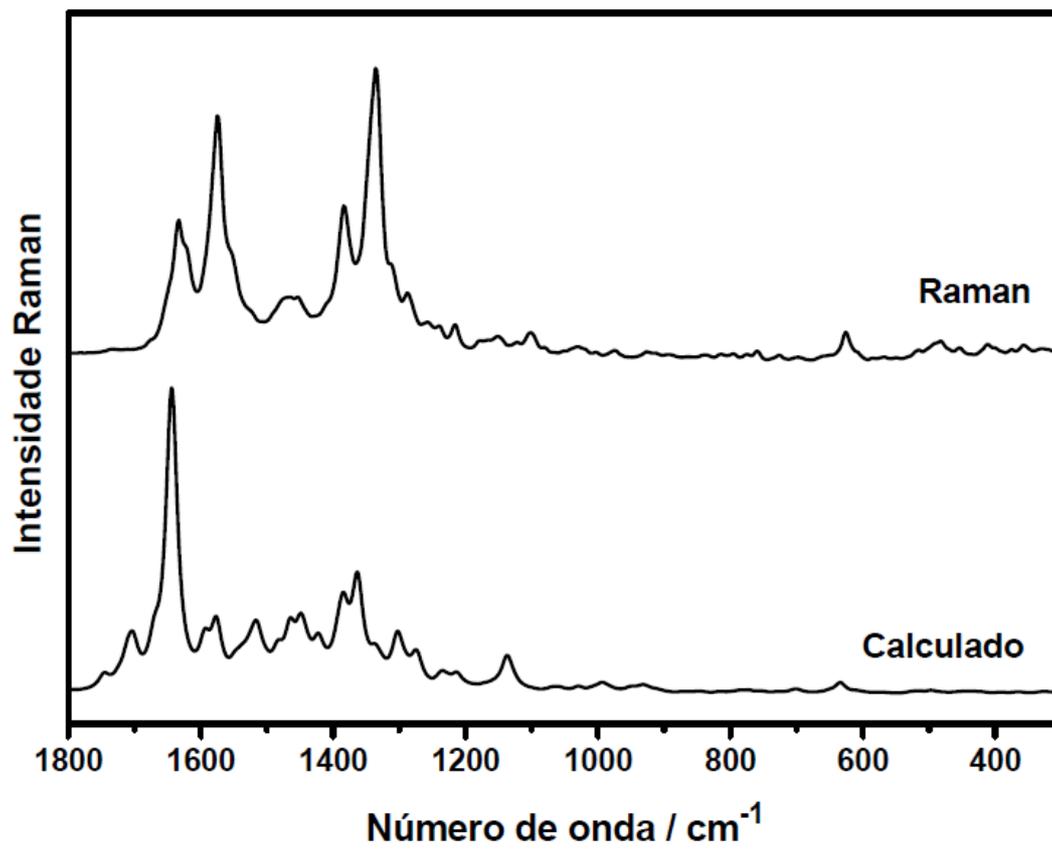
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 56 mostra os espectros Raman e SERS da RP adsorvida em superfície de ouro obtido na ausência e presença do modificador de superfície ME, utilizando radiação excitante de comprimento de onda em 1064 nm. A Figura 57 mostra o espectro Raman da RP obtido utilizando radiação excitante de comprimento de onda em 1064 nm junto com o espectro Raman calculado da RP que foi utilizado para a atribuição vibracional dos espectros Raman e SERS. A atribuição vibracional das bandas Raman da RP está representada na Tabela 8.

Figura 56: Espectros Raman e SERS da RP adsorvida em AuNP na ausência e presença do ME  $\lambda_0=1064$  nm



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Figura 57: Espectros Raman experimental e teórico da RP.  $\lambda_0=1064$  nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Tabela 8: Atribuições vibracionais do espectro Raman da RP obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada.

Raman 1064 nm	Raman 632.8 nm	RP (Teórico)	Atribuição
1648 (sh)	1650(sh)	1746	$\nu(\text{C}^{43}\text{C}^{56})$
1633	1633	1711	$\nu(\text{C}^{26}\text{O}^{27})$
1623(sh)	1623	1702	$\nu(\text{C}^{30}\text{C}^{32}) + \nu(\text{C}^{33}\text{C}^{34})$
1585(sh)	1584(sh)	1670	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}} + \nu(\text{C}^9\text{N}^8) + \nu(\text{C}^{26}\text{O}^{27})$
1574	1574	1643, 1646	$\nu(\text{C}^9\text{N}^8) + \nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}}$
1554(sh)	1555	1594	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}}$
1476	1480(?)	1516	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3) + \delta(\text{NH}) + \delta(\text{OH})$
1468	1470(?)	1484	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}} + \nu(\text{CO})_{\text{B,C}}$
1454	1455(?)	1465	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}} + \nu(\text{C}^{12}\text{O}^{17})$
1383	1383	1423	$\nu(\text{CC}, \text{CN})_{\text{D}} + \nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}}$
-	1374	1390	$\nu(\text{CC}, \text{CN})_{\text{D}} + \nu(\text{N}^3\text{N}^8)$
1346(sh)	1342(sh)	1385	$\nu(\text{CC})_{\text{C}} + \delta(\text{CH})_{\text{D}} + \nu(\text{C}^9\text{O}^{10})$
1335	1333	1363	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}}$
1312	1311	1336	$\nu(\text{N}^3\text{N}^8) + \delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
1287	1287	1302	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B,C}} + \nu(\text{C}^{25}\text{C}^{47})$
1254	1263	1275	$\nu(\text{CC})_{\text{A,B}} + \nu(\text{C}^{19}\text{O}^{23}) + \nu(\text{C}^{20}\text{C}^{55})$
-	1239	1270	$\nu(\text{C}^{41}\text{C}^{42}) + \delta(\text{CH})$
1216	1216	1213	$\nu(\text{N}^3\text{N}^8) + \nu(\text{C}^{28}\text{N}^{18})$
-	1177	1188	$\nu(\text{C}^{25}\text{O}^{57}) + \nu(\text{C}^{43}\text{C}^{42}\text{O}^{58})$
-	1154	1170	$\delta(\text{C}^7\text{N}^6)$
1103	1102	1138	$\nu(\text{N}^3\text{N}^8\text{C}^9\text{C}^{10}) + \nu(\text{CC})_{\text{C}}$
-	1015	997	$\nu(\text{CC}, \text{CO}, \text{CN})_{\text{A,B,C,D}} + \nu(\text{C}^{25}\text{O}^{57})$
-	976(?)	(?)	$\nu(\text{C}^{32}\text{C}^{33}) + \nu(\text{C}^{37}\text{C}^{50}) + \nu(\text{CC})_{\text{D}}$
-	927	934	$\nu(\text{C}^{25}\text{O}^{57}) + \nu(\text{C}^{41}\text{C}^{42}) + \nu(\text{CC})_{\text{A, oop}}$
-	760	771	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C, oop}} + \nu(\text{CC}, \text{CO}, \text{CN})_{\text{A,D}}$
626	624	634	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C, oop}} + \delta(\text{CC}, \text{CN})_{\text{D}} + \delta(\text{C}^{31}\text{C}^{30}\text{C}^{32})$
-	518	517	$\delta(\text{CC}, \text{CN})_{\text{D}} + \delta(\text{N}^3\text{N}^8)$
-	491(sh)	494	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C, oop}} + \delta(\text{CC})_{\text{skl}}$
482	478	485	$\nu(\text{CC})_{\text{C}} + \delta(\text{CC})_{\text{skl}}$
-	470	476	$\delta(\text{CC}, \text{CN})_{\text{D}} + \delta(\text{C}^{15}\text{O}^{16})$
-	455	459	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C, oop}} + \delta(\text{CC})_{\text{skl}}$
412	410	419	$\delta(\text{CC})_{\text{C, oop}} + \delta(\text{CC})_{\text{skl}}$
-	356	365	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C, oop}} + \delta(\text{N}^3\text{N}^8)$

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

No espectro Raman da RP obtido utilizando radiação excitante 633 nm, as bandas Raman na região entre 1300-1400  $\text{cm}^{-1}$  são mais intensa do que na região entre 1500-1650  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 55). As bandas Raman nessas duas regiões espectrais apresentaram intensidades similares quando os espectros foram obtidos utilizando-se radiação excitante em 1064 nm (Figura 56). As intensidades relativas obtidas utilizando-se radiação excitante em 633 nm são intermediárias quando comparadas com o observado no espectro Raman ressonante obtido utilizando-se radiação excitante em 532 nm, indicando que embora exista uma baixa influência, a presença de efeito Raman pré – ressonante não pode ser desconsiderado quando utiliza-se excitação na região do vermelho.

O espectro SERS da RP adsorvida em AuNP obtido utilizando-se excitação em 633 nm (Figura 55), mostra uma intensificação das bandas em *ca.* 1280, 1450 e 1540  $\text{cm}^{-1}$ , todas atribuídas aos estiramentos CC dos anéis A, B e C, que são mais intensificadas na presença do 2-mercaptoetanol. Portanto, a presença do 2-mercaptoetanol mostra um padrão espectral mais próximo do espectro SERS obtido utilizando-se excitação em 1064 nm. Novamente, a presença do 2-mercaptoetanol levou a um padrão espectral que é menos influenciado pelo o efeito Raman ressonante. Este comportamento pode ser explicado supondo que para a RP adsorvida sobre a superfície metálica do ouro, há comprometimento do sistema  $\pi$  conjugado, quando o 2-mercaptoetanol está coadsorvido, levando a mudanças na estrutura do grupo cromóforo através do mecanismo de transferência de carga.

O espectro SERS da RP adsorvida em AuNP obtido utilizando-se excitação em 1064 nm não apresentou mudanças significativas na presença e na ausência do 2-mercaptoetanol (Figura 56), o que permite sugerir que embora o 2-mercaptoetanol modifique a interação com a superfície metálica, esta modificação não é forte o suficiente para modificar o sítio molecular envolvido na interação com a superfície metálica do ouro. As bandas mais intensas em 1340, 1384, 1584 e 1635  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas aos modos normais que apresentam contribuições dos estiramentos CC, CN e CO do sistema  $\pi$ -conjugado, tem intensidades relativas próximas do espectro Raman da RP no estado sólido. Além disso, as intensas bandas SERS em 1557, 1287 e 1009  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas aos estiramentos CC dos anéis A, B e C e as bandas em 1360, 1312 e 1233  $\text{cm}^{-1}$  que apresentam contribuições dos estiramentos  $\text{N}^3\text{N}^8$  permitem inferir que o sistema  $\pi$ -conjugado está envolvido na interação com a superfície metálica do ouro.

Tal hipótese é reforçada pela intensificação das bandas SERS em 765, 628, 490 e 355  $\text{cm}^{-1}$ , que são atribuídas aos modos normais que apresentam contribuições de deformação angular CC fora do plano dos anéis A,B e C.

No espectro SERS da RP adsorvida em AgNP obtido utilizando-se excitação em 633 nm (Figura 55), o padrão espectral na presença e ausência do 2-mercaptoetanol são similares. As bandas intensificadas são observadas em 1645, 1435 e 1265  $\text{cm}^{-1}$ , que são atribuídas aos modos normais que envolvem os estiramentos CC,CO dos anéis A,B e C. Na presença do cloreto o espectro SERS mostrou claras mudanças com a intensificação das bandas em 1589, 1382 e 1341  $\text{cm}^{-1}$  que são o mesmo conjunto de bandas observadas no espectro Raman da RP no estado sólido. Este comportamento diferente pode ser explicado supondo que a adsorção ocorra através da formação de par iônico, envolvendo a interação com o átomo  $\text{N}^6$  do cátion amônio com o ânion cloreto presente na superfície da prata. Dessa forma, o sistema  $\pi$ -conjugado pode estar menos envolvido na interação com a superfície metálica da prata, preservando a contribuição do efeito Raman pré ressonante. A intensificação das bandas SERS em 1382 e 464  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas aos modos normais envolvendo os estiramentos CC,CN do anel D reforçam esta hipótese.

As diferenças observadas nos espectros SERS da RP em ambos os metais mostram que a interação com a prata apresenta uma maior interferência na estrutura eletrônica do grupo cromóforo que o ouro.

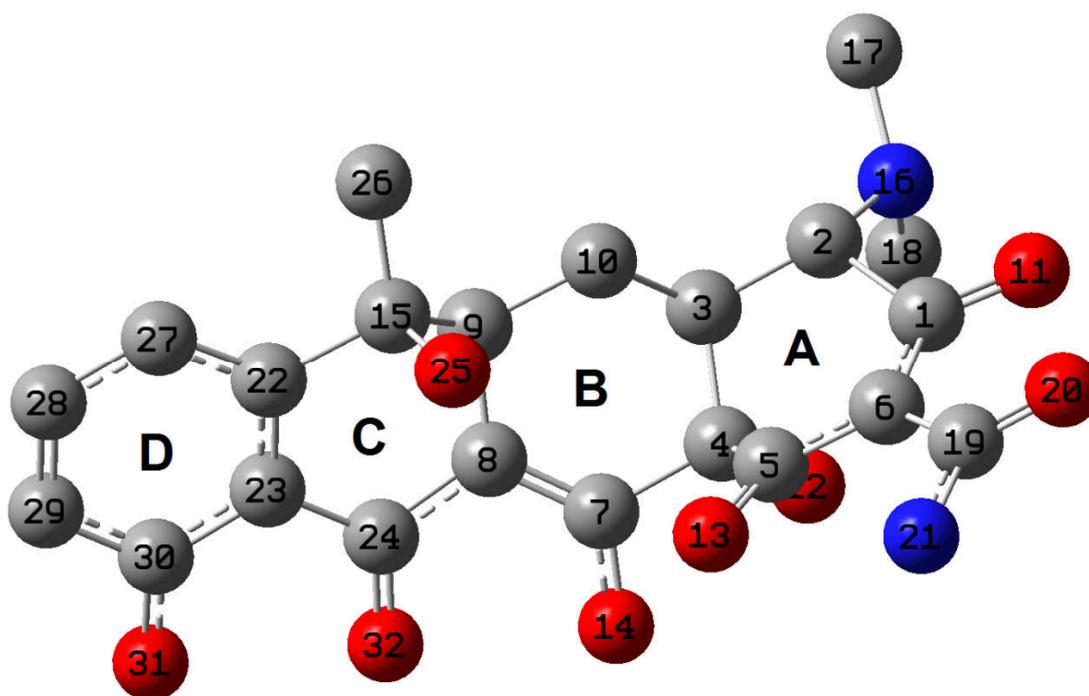
#### 4.5.7. Tetraciclina (TC)

##### 4.5.7.1 Espectroscopia Raman e SERS da TC

Para o estudo da citotoxicidade da composição de AgNPs, QUIT e antibióticos em células de fibroblastos bovinos foi escolhido o antibiótico TC. Para tanto, inicialmente realizamos o estudo da adsorção da TC sobre a superfície metálica das AgNPs por espectroscopia SERS, uma vez que esta técnica permite compreender se este antibiótico está ou não fortemente adsorvido na superfície das AgNPs.

A estrutura otimizada da TC juntamente com os átomos rotulados que foram utilizados para a atribuição vibracional é apresentada na Figura 58.

Figura 58: Estrutura otimizada da TC.

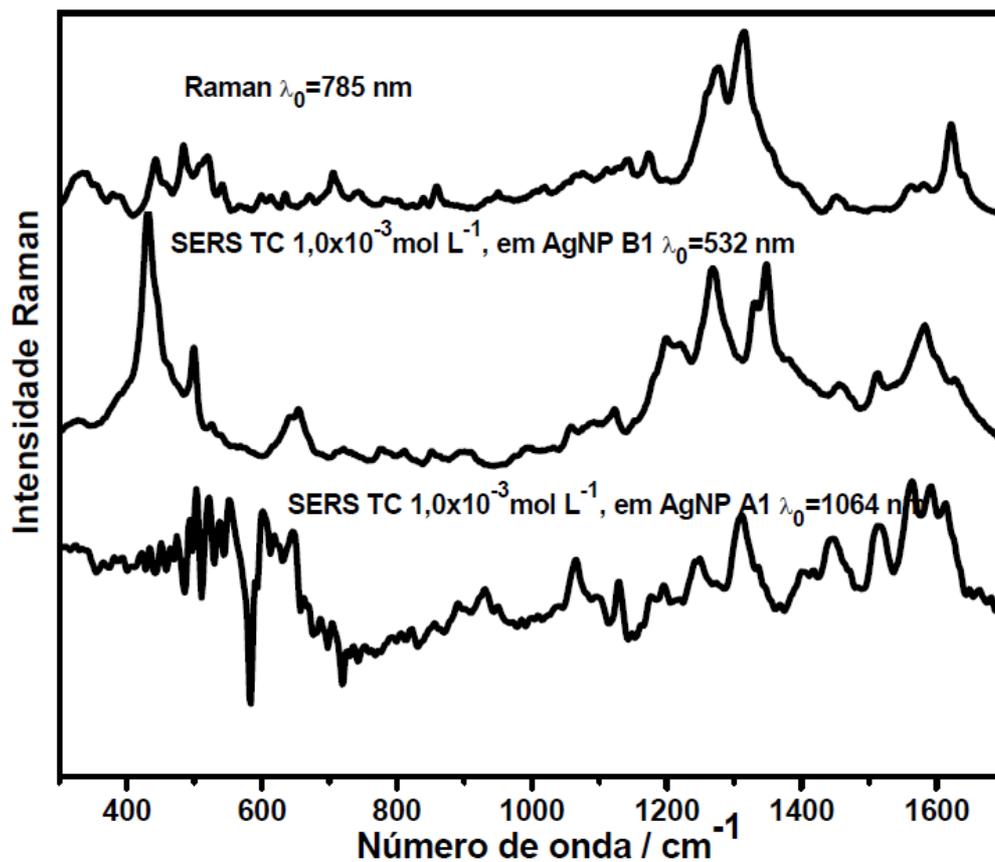


Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização da estrutura. Os rótulos foram utilizados para a atribuição vibracional dos espectros SERS.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O espectro Raman SERS da TC obtidos utilizando o coloide B1 ( $\lambda_0 = 532$  nm) e o coloide A1 ( $\lambda_0 = 1064$  nm) são apresentados na Figura 59. A atribuição vibracional tentativa para a TC está apresentada na Tabela 9. A atribuição foi baseada em nosso trabalho prévio. (FILGUEIRAS, A. L. et al., 2015).

Figura 59: Espectros Raman e SERS da TC adsorvida sobre os coloides B1 e A1 utilizando diferentes radiações excitantes



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Tabela 9: Atribuição vibracional do espectro Raman e dos espectros SERS da TC obtidos a partir dos dados experimentais.

Raman	SERS	SERS	Atribuição
	1064	532	
1625	1610	1613	$\nu(\text{C}^7\text{C}^8) + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32})$
1581	1583	1591	$\nu(\text{CC})_{\text{D}} + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32})$
1561	1562(sh)	1563	$\nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32}) + \nu(\text{CC})_{\text{D}}$
1356	1350	1335	$\nu(\text{C}^{30}\text{O}^{31}) + \delta(\text{CC})_{\text{B,C}}$
1313	1330	1310	$\nu(\text{C}^3\text{C}^4) + \nu(\text{C}^{30}\text{O}^{31})$
1252	1267	1248	$\nu(\text{CC})_{\text{C,D}}$
669	662	-	$\delta(\text{CC})_{\text{B,C,D}}$
484	502	-	$\delta(\text{C}^7\text{C}^8\text{C}^{24})$
442	432	-	$\delta(\text{C}^7\text{O}^{14}) + \delta(\text{C}^{24}\text{O}^{32})$

$\nu$  - estiramento;  $\delta$  - deformação angular; anéis A,B,C,D são rotulados na Figura 55;

As bandas SERS em 1610, 1583, 1562 e 432  $\text{cm}^{-1}$  que são atribuídas aos estiramentos e a deformação angular da carbonila  $\text{C}^{24}\text{O}^{32}$  e aos estiramentos e a deformação angular CC do anel D, são as bandas mais intensificadas do espectro SERS da TC adsorvida sobre o coloide de prata preparado com QUIT. O mesmo conjunto de bandas também são intensificadas no espectro SERS da TC adsorvida sobre o coloide A1, com exceção das SERS em 502 e 432  $\text{cm}^{-1}$  que não aparecem no espectro da TC adsorvida sobre o coloide A1. A intensificação desse conjunto de bandas é devida a interação da TC com a superfície metálica que é através da carbonila  $\text{C}^{24}\text{O}^{32}$  com o anel D próximo a superfície metálica. Além disso, as diferenças significativas quando comparamos o espectro Raman normal com os espectros SERS da TC são devidas a forte interação da TC com a superfície metálica da prata, e devido a isso esse antibiótico foi escolhido para o estudo da citotoxicidade da composição de AgNPs, QUIT e TC em células de fibroblastos e o estudo da adsorção da TC sobre essas AgNPs.

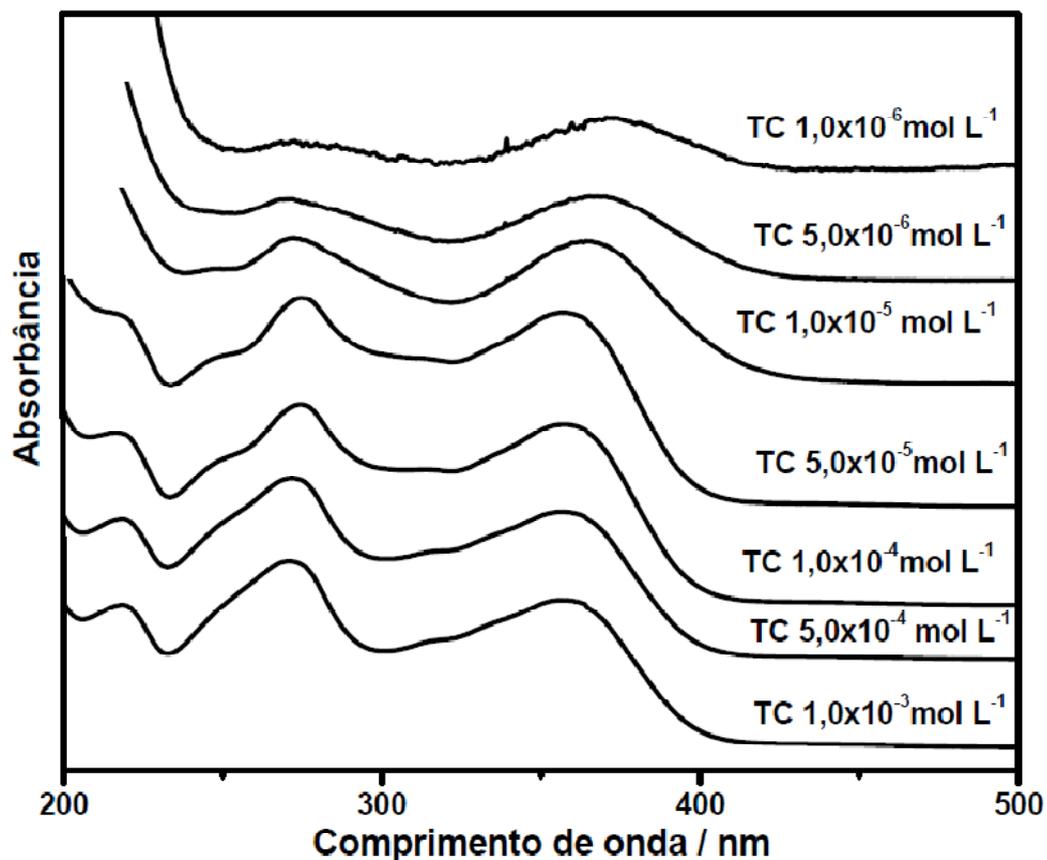
#### 4.5.7.2. Estudo da adsorção da TC por espectroscopia UV-VIS

O estudo da adsorção da TC sobre a superfície das AgNPs é importante para quantificar a quantidade de TC que está adsorvida sobre a superfície das AgNPs, e assim verificarmos o quanto de TC será liberado no sistema biológico. Este procedimento é importante para viabilizar este sistema para futuras aplicações *in vivo*.

Para o estudo da quantidade de TC adsorvida na superfície do coloide B1 foi feito inicialmente uma curva de calibração por espectroscopia UV-VIS na qual variou-se a concentração de TC de  $1,0 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. Posteriormente foi realizada a centrifugação do coloide B1 após a mistura com a TC adsorvida nas concentrações  $1,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> e  $1,0 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> com rotação de 19.000 e 21.000 rpm, respectivamente.

A Figura 60 mostra os espectros UV-VIS de diferentes soluções de TC, variando-se a concentração de  $1,0 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. Quando comparamos os espectros UV-VIS para diferentes concentrações de TC verificamos que há mudanças no padrão espectral, que são atribuídas aos monômeros de TC para menores concentrações e a formação de dímeros de TC em maiores concentrações. Devido a isto, o ajuste para estas concentrações não ficou linear.

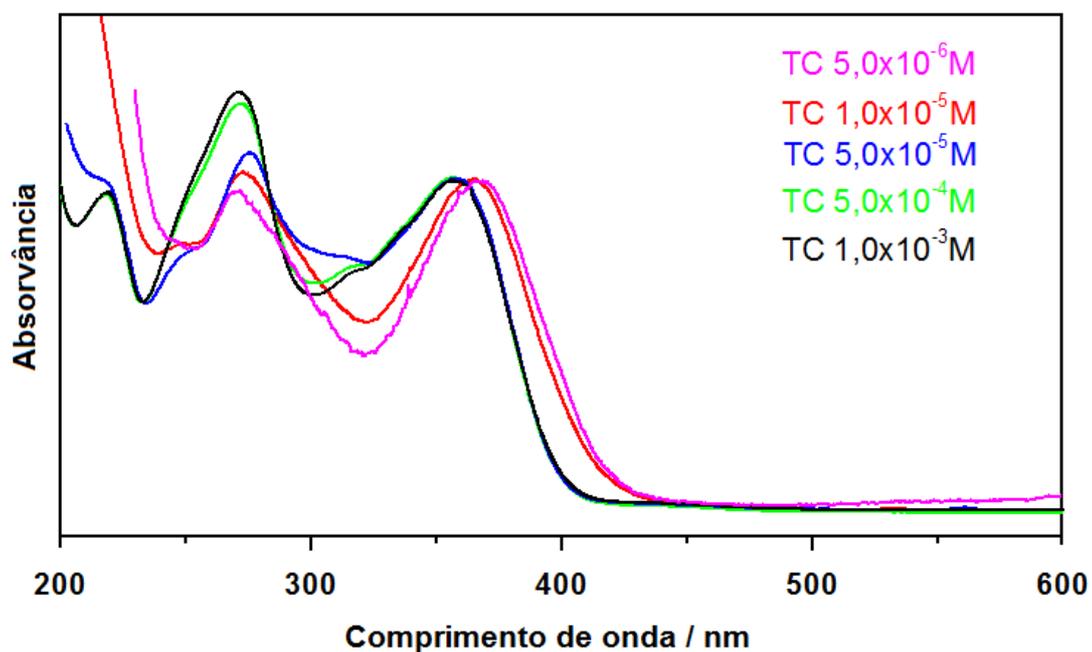
Figura 60: Espectros UV-VIS das soluções de TC em diferentes concentrações



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 61 mostra os mesmos espectros da Figura 59 normalizados pela banda em c.a. 350 nm. A presença dos monômeros de TC em baixas concentrações e dímeros de TC em concentrações maiores fica evidenciada através desta normalização.

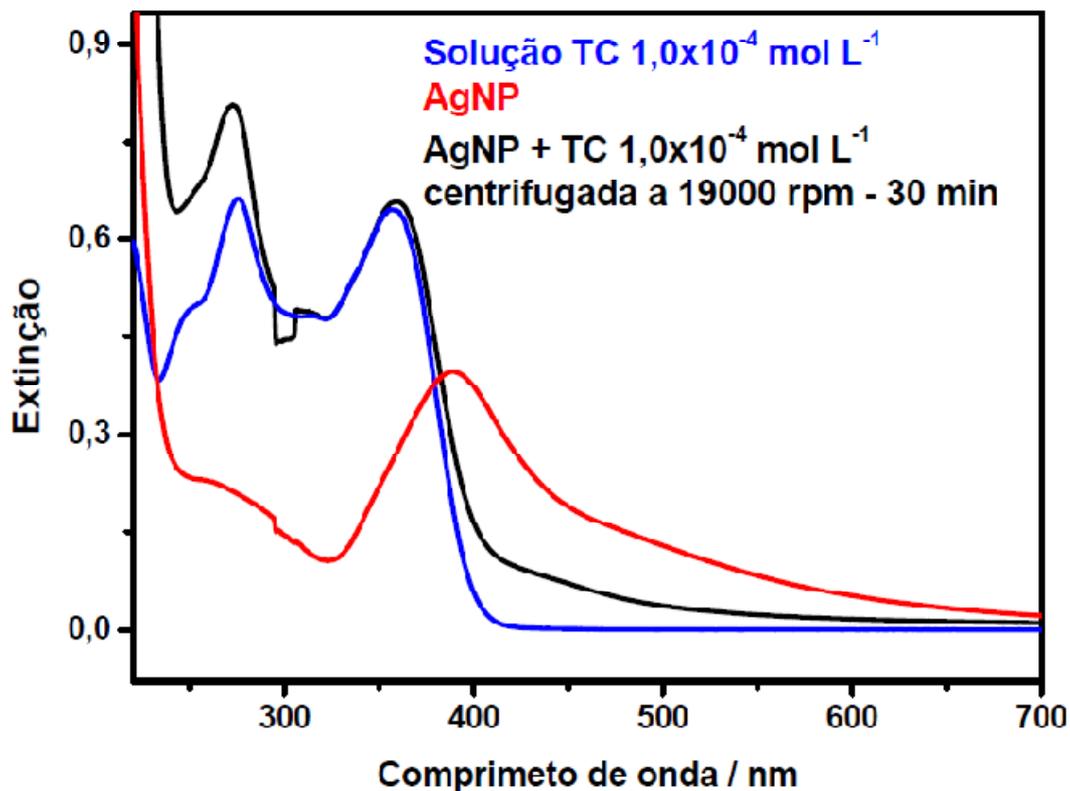
Figura 61: Espectros UV-VIS das soluções de TC normalizados.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 62 mostra os espectros UV-VIS da suspensão aquosa B1, da solução de TC  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e da suspensão aquosa B1 na presença de TC  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  centrifugadas a 19000 rpm. Como podemos observar na Figura 61 a centrifugação não foi suficiente para separarmos as AgNPs da solução de TC.

Figura 62: Espectros UV-VIS da solução de TC, da suspensão de AgNP e da suspensão de AgNP na presença de TC centrifugadas a 19 000 rpm

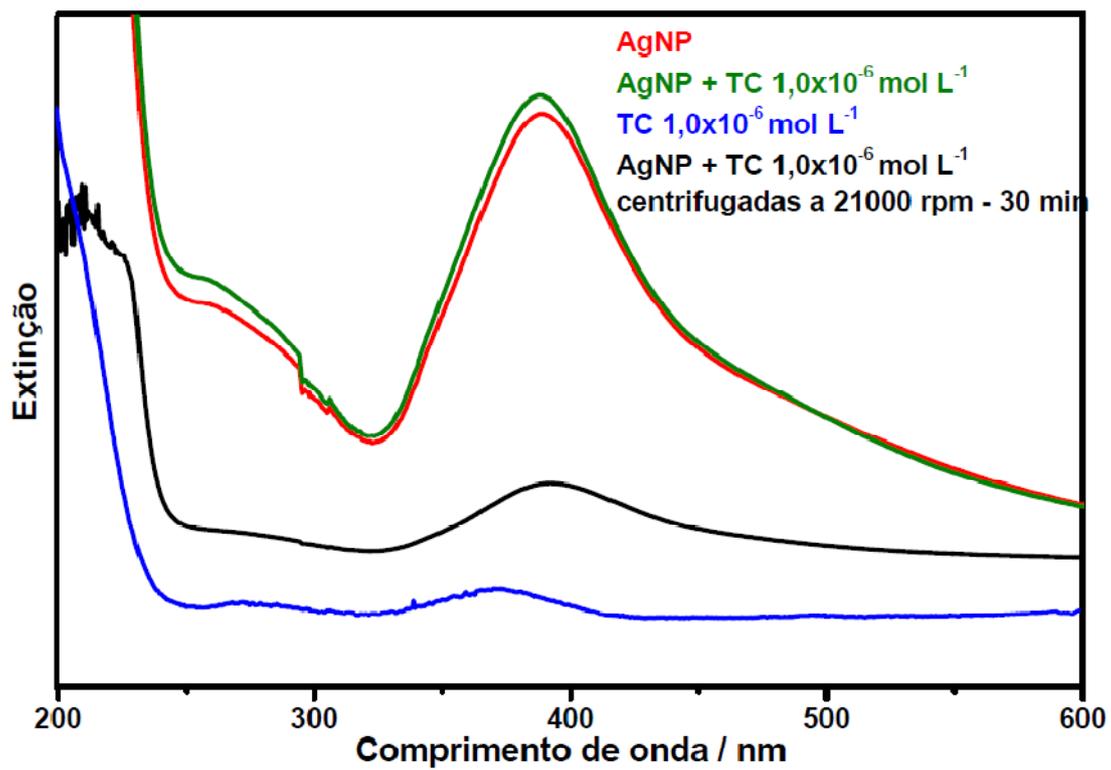


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Esse comportamento foi verificado ainda, quando utilizou-se TC  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  adsorvida no coloide B1 e centrifugadas a 21000 rpm (Figura 63), concentração que corresponde a formação de monocamada de TC adsorvida na superfície das AgNPs, onde observa-se ainda um máximo de extinção das AgNPs em 390 nm.

Para conseguirmos quantificar a quantidade de TC que esta adsorvida na superfície das AgNPs é necessário o uso de uma ultracentrífuga que consiga separar as AgNPs da solução.

Figura 63: Espectros UV-VIS da suspensão coloidal B1 na ausência e presença de TC e da solução de TC



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

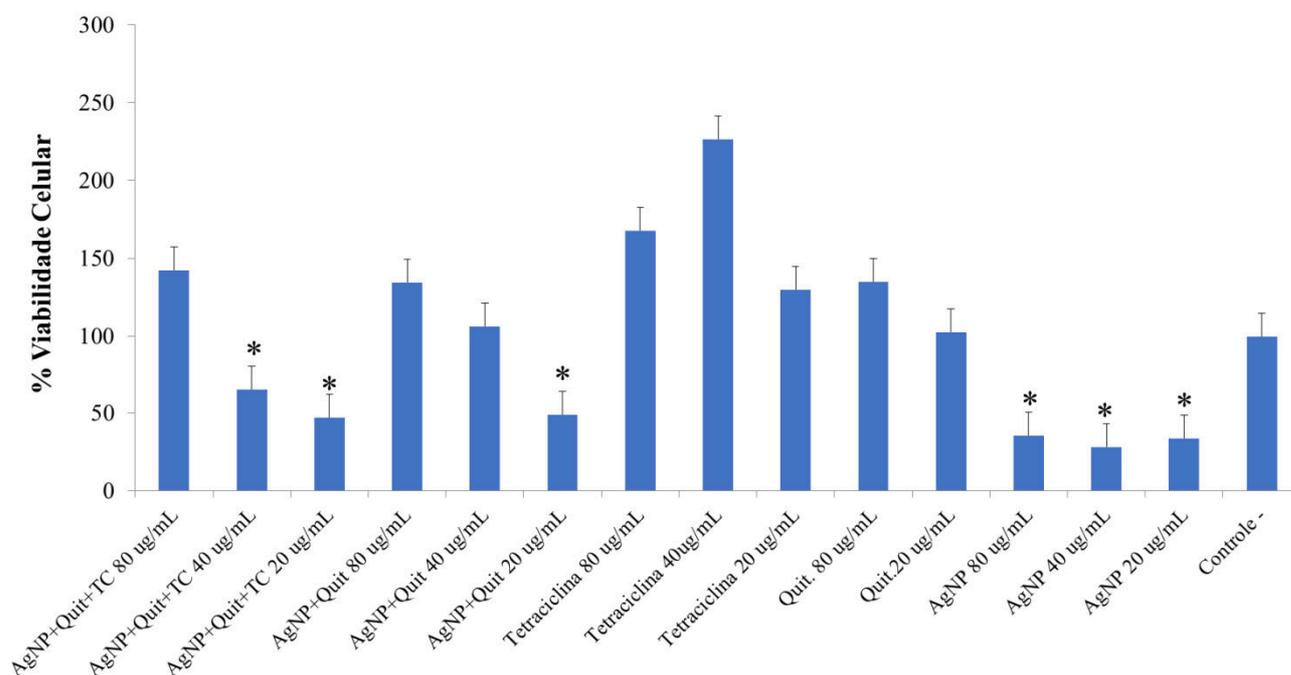
#### 4.6. EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS

##### 4.6.1. Citotoxicidade das AgNP frente células de fibroblastos bovinos

Os ensaios de toxicidade para AgNP, AgNP+QUIT, TC e AgNP+QUIT+TC foram realizados utilizando fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. Para tanto, foram realizados 3 experimentos para a avaliação da viabilidade celular. O experimento I foi realizado com concentrações altas de droga, enquanto que os experimentos II e III foram realizados para concentrações próximas das concentrações inibitórias mínima (CIM) obtidas em nosso trabalho prévio (FILGUEIRAS A.L., 2013). O experimento I foi realizado para avaliar a toxicidade das diferentes combinações de AgNP, da TC e da QUIT nas concentrações de 80, 40 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente os fibroblastos nos tempos de 24 e 48 h, respectivamente (Figuras 64 e 65). De acordo com os resultados, a solução de QUIT não foi tóxica para os fibroblastos bovinos. Comportamento similar foi observado para o antibiótico TC nos tempos de 24 e 48 horas. No entanto, para as AgNP, a viabilidade celular foi alterada nas concentrações de 80 (35%), 40 (28%) e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (33 %) após 24 horas com diferença significativa entre os tratamentos e a amostra controle. Foi observada ainda, diferença significativa entre a amostra controle e os tratamentos de AgNP + QUIT + TC nas concentrações de 40 (65%) e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (46 %) e para o tratamento de AgNP+QUIT na concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (48 %). Para o tempo de 48 h a viabilidade celular nas concentrações de 80(52%), 40(36%) e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (41%) também diferiram significativamente da amostra controle. Tanto para a combinação AgNP+QUIT+TC quanto para a combinação AgNP+QUIT foi observado maior viabilidade para as maiores concentrações de droga 142 e 134%, respectivamente após 24 h de interação e 68 e 84%, respectivamente após 48 h de interação. Isto ocorreu devido a agregação das AgNP na presença de QUIT, que coagulou no pH do meio DMEM que é o meio biológico para o crescimento das células de fibroblastos, tal agregação está mostrada na Figura 65. Esta agregação pode ter influenciado nos valores de absorvância. Para contornar este problema, nos experimentos II e III foram feitas avaliações utilizando amostras contendo apenas meio DMEM com AgNP+QUIT (controle relativo). Os valores dessas amostras foram utilizadas para correção das leituras de absorvância, para posterior cálculo da viabilidade celular. Além disso, as concentrações utilizadas neste primeiro teste estavam muito altas em relação aos valores de concentração inibitória mínima que

foram obtidas no teste que avaliou a sinergia das interações das AgNP+QUIT+antibiótico frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FILGUEIRAS A.L., 2013). Logo, foram escolhidas as concentrações 2, 0,2 e 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  que estavam próximas dos valores obtidos nos experimentos contra bactérias.

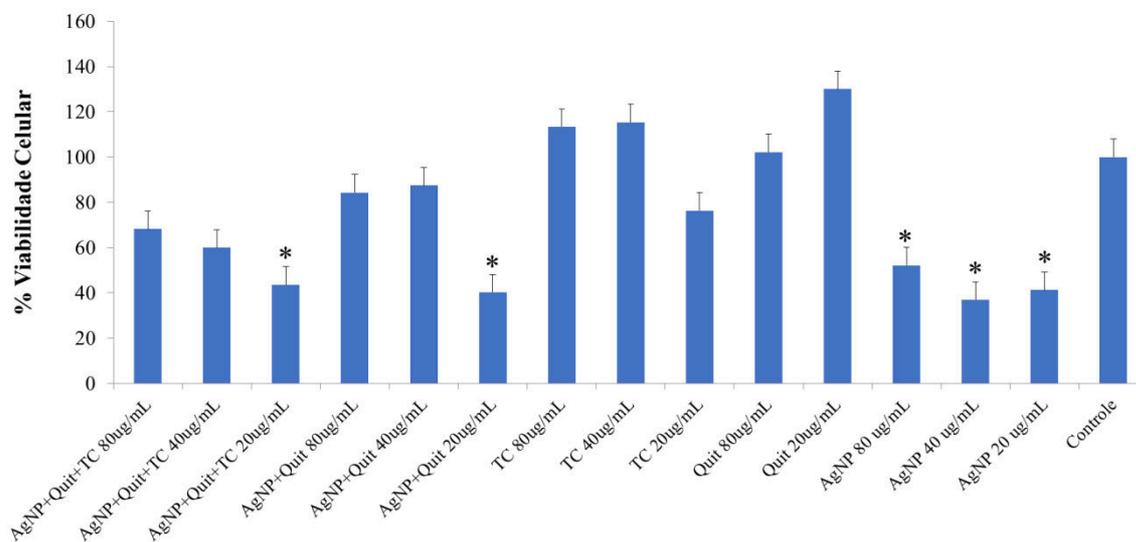
Figura 64: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 80,40 e 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 24 h de interação



\* - diferença estatística entre a amostra controle e o tratamento.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Figura 65: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 80,40 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 48 h de interação



\* - diferença estatística entre a amostra controle e o tratamento.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Figura 66: Agregação das AgNP com a variação da concentração



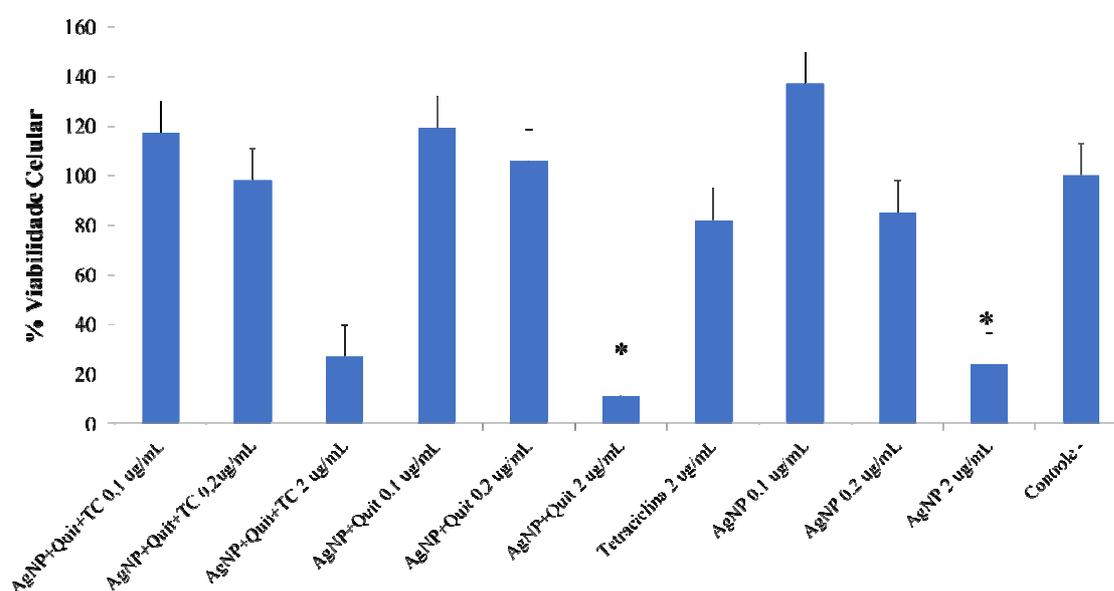
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 67 mostra os dados de citotoxicidade do experimento II realizado para as diferentes combinações de AgNP e da TC nas concentrações de 2, 0,2 e 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a células de fibroblastos bovinos realizado no tempo de 48 horas. As Figuras 68 e 69 mostram a repetição do experimento II nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente, o qual foi denominado de experimento III.

Como a TC apresentou baixa citotoxicidade na faixa de concentração 80-20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foram escolhidas somente a concentração de 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para os experimentos II e III, e como pode-se observar esta se mostrou pouco tóxica.

A partir da figura 69 observamos que os tratamentos de AgNP+QUIT+TC (27%), AgNP+QUIT (11%) e AgNP (23%) na concentração de 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  afetaram a viabilidade celular. Os experimentos II e III mostraram o mesmo comportamento de viabilidade celular, o que torna os dados apresentados confiáveis.

Figura 67: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 2, 0,2 e 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 48 h de interação

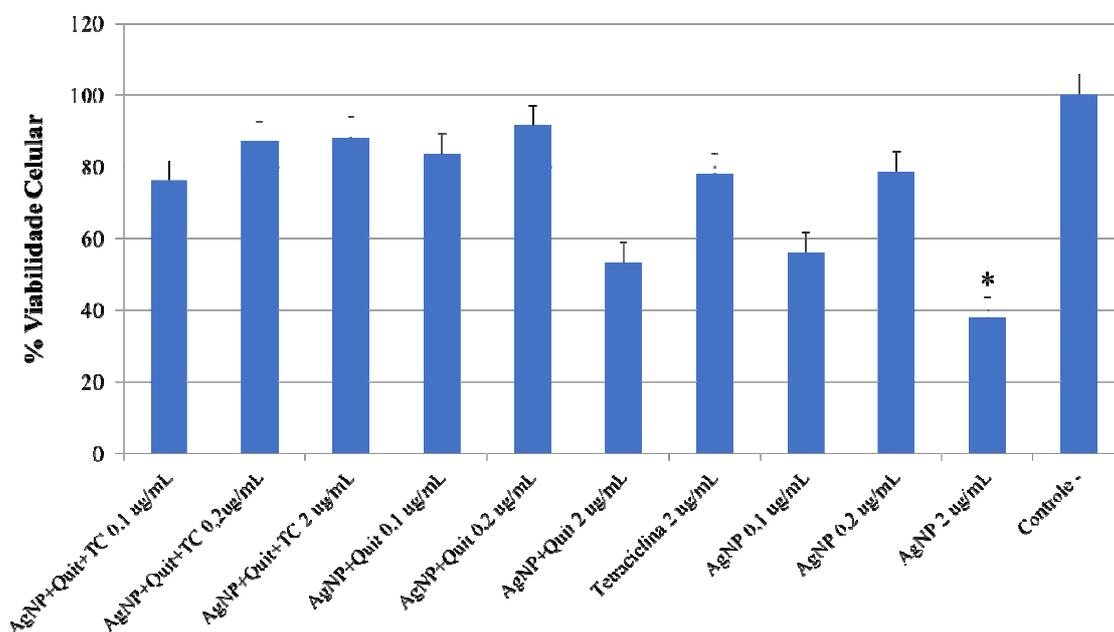


\* - diferença estatística entre a amostra controle e o tratamento.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Para o experimento III a análise estatística mostrou que as células tratadas com AgNP na concentração de  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram viabilidade de 37% e diferiu estatisticamente do controle para o tempo de interação de 24 h. Para o tempo de 48 h os tratamentos de AgNP e AgNP+QUIT na concentração de  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram viabilidade de 36 e 32 % e diferiram estatisticamente do controle.

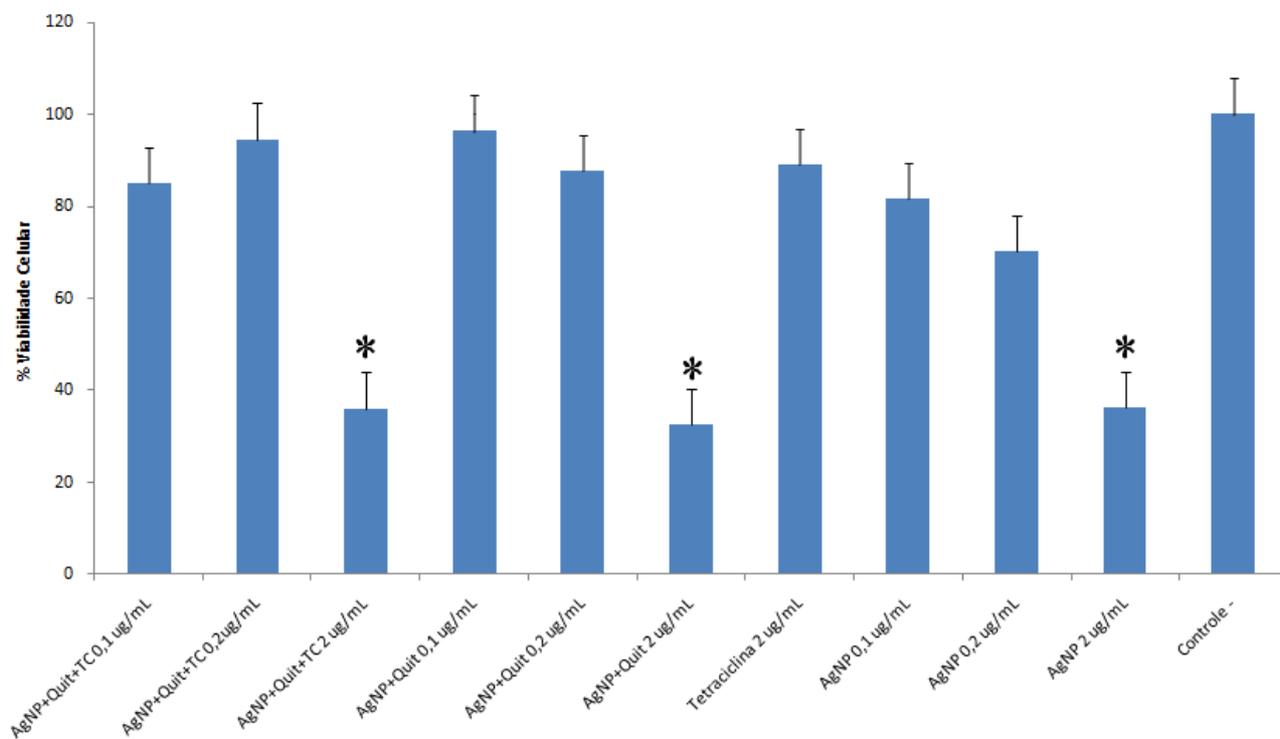
Figura 68: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 2, 0,2 e 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 24 h de interação



\*- diferença estatística entre a amostra controle e o tratamento.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Figura 69: Viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos frente as diferentes combinações de AgNP nas concentrações de 2, 0,2 e 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 48 h de interação



\*- diferença estatística entre a amostra controle e o tratamento.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Foram obtidos ainda, as fotomicrografias das células de fibroblastos bovinos na presença dos tratamentos. As Figuras 70, 71 e 72 mostram os fibroblastos bovinos na presença dos diferentes tratamentos com as AgNP com tempo de interação de 24 h.

Como pode-se observar os tratamentos das AgNP+QUIT+TC, AgNP+QUIT e AgNP nas 3 concentrações utilizadas promovem modificações na morfologia das células de fibroblastos bovinos, indicando que há um processo de citotoxicidade destes tratamentos. No entanto, esse único parâmetro não é determinante da morte celular, o que pode ser observado pelos valores de viabilidade nos ensaios de MTT que são comparáveis com a amostra do controle, demonstrando que grande parte das células permaneceram viáveis.

Figura 70: Fotomicrografias das células de fibroblastos bovino na ausência e presença do tratamento ternário AgNP+QUIT+TC

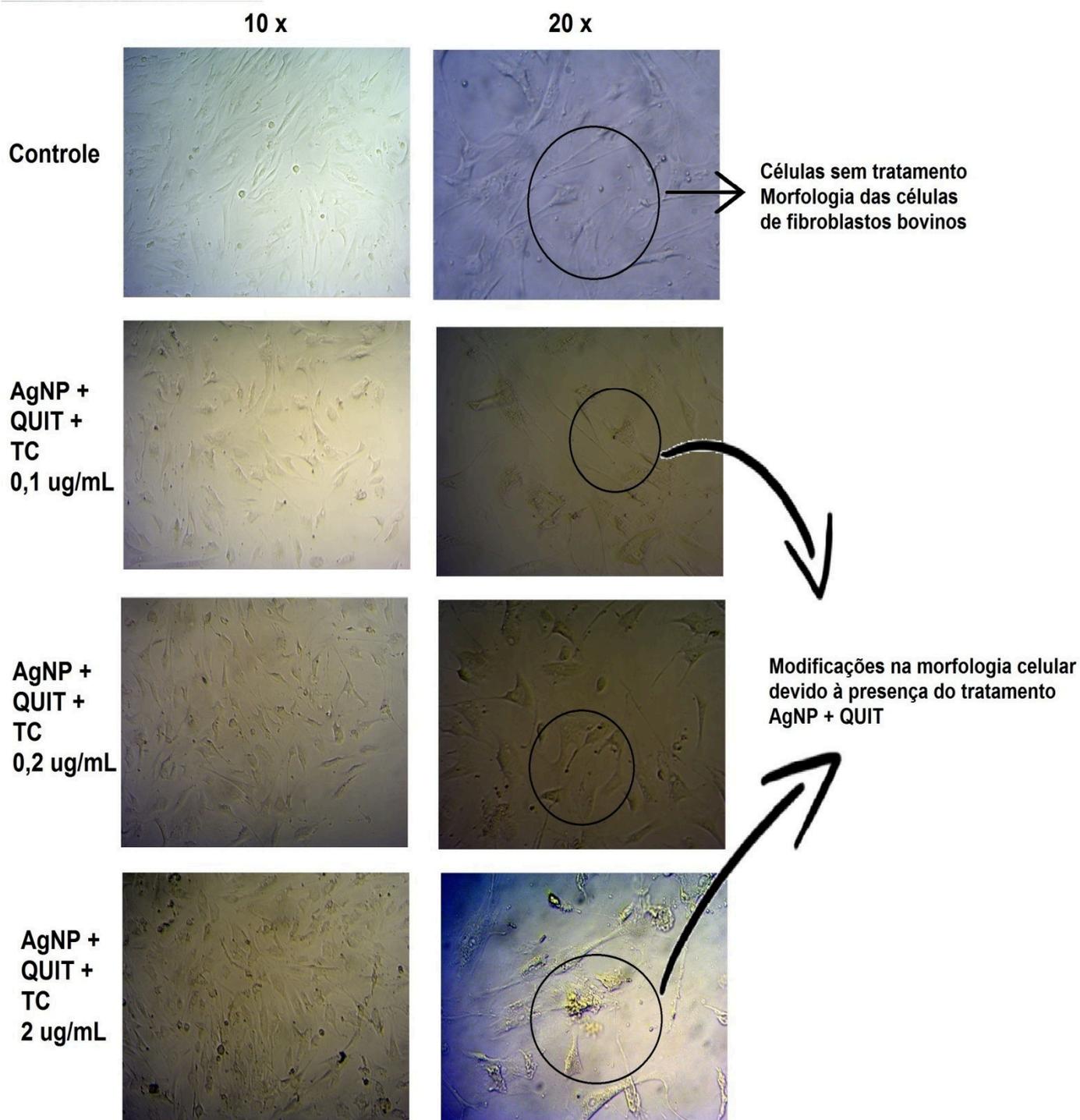


Figura 71: Fotomicrografias das células de fibroblastos bovino na presença do tratamento binário AgNP+QUIT

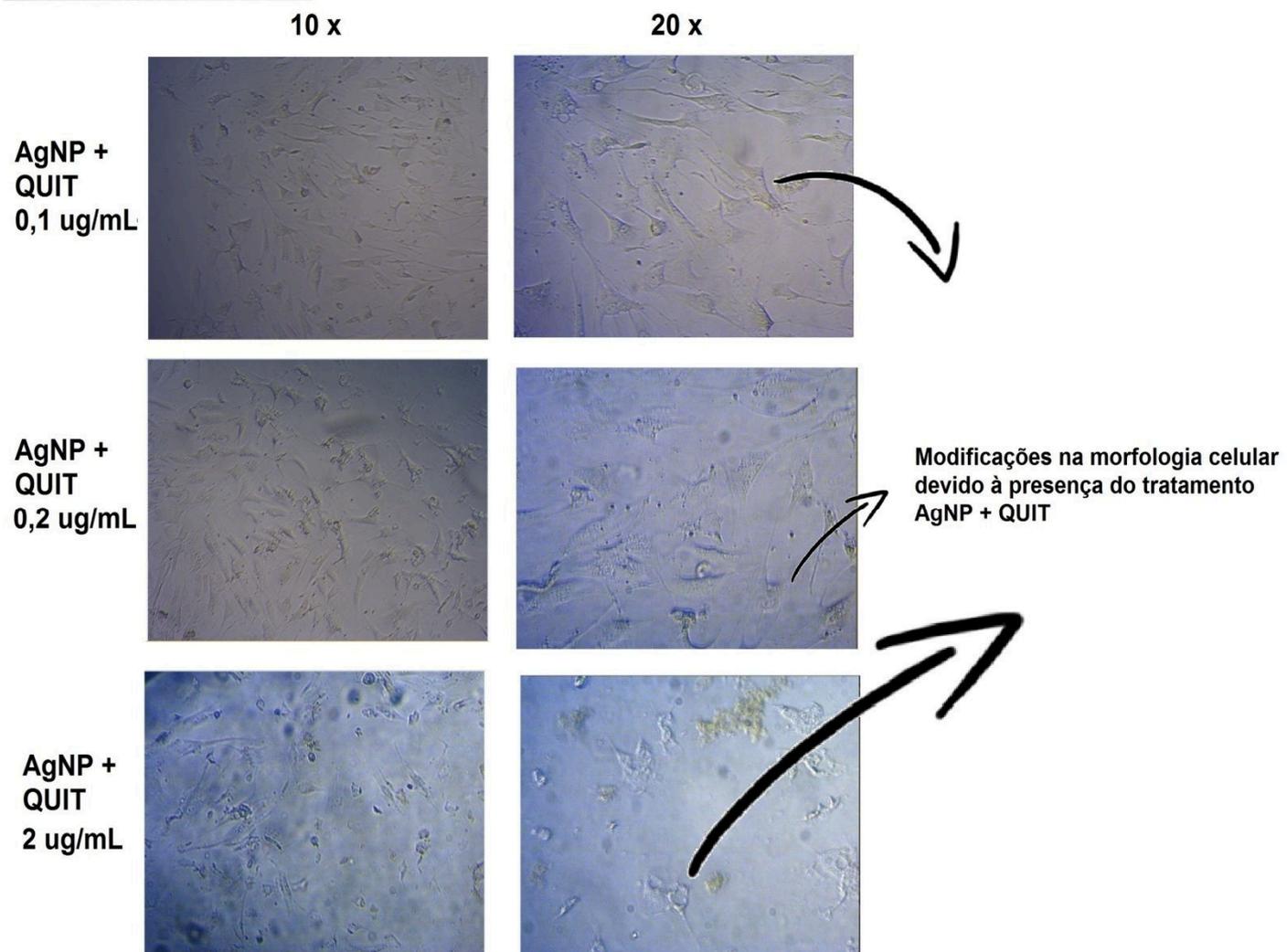
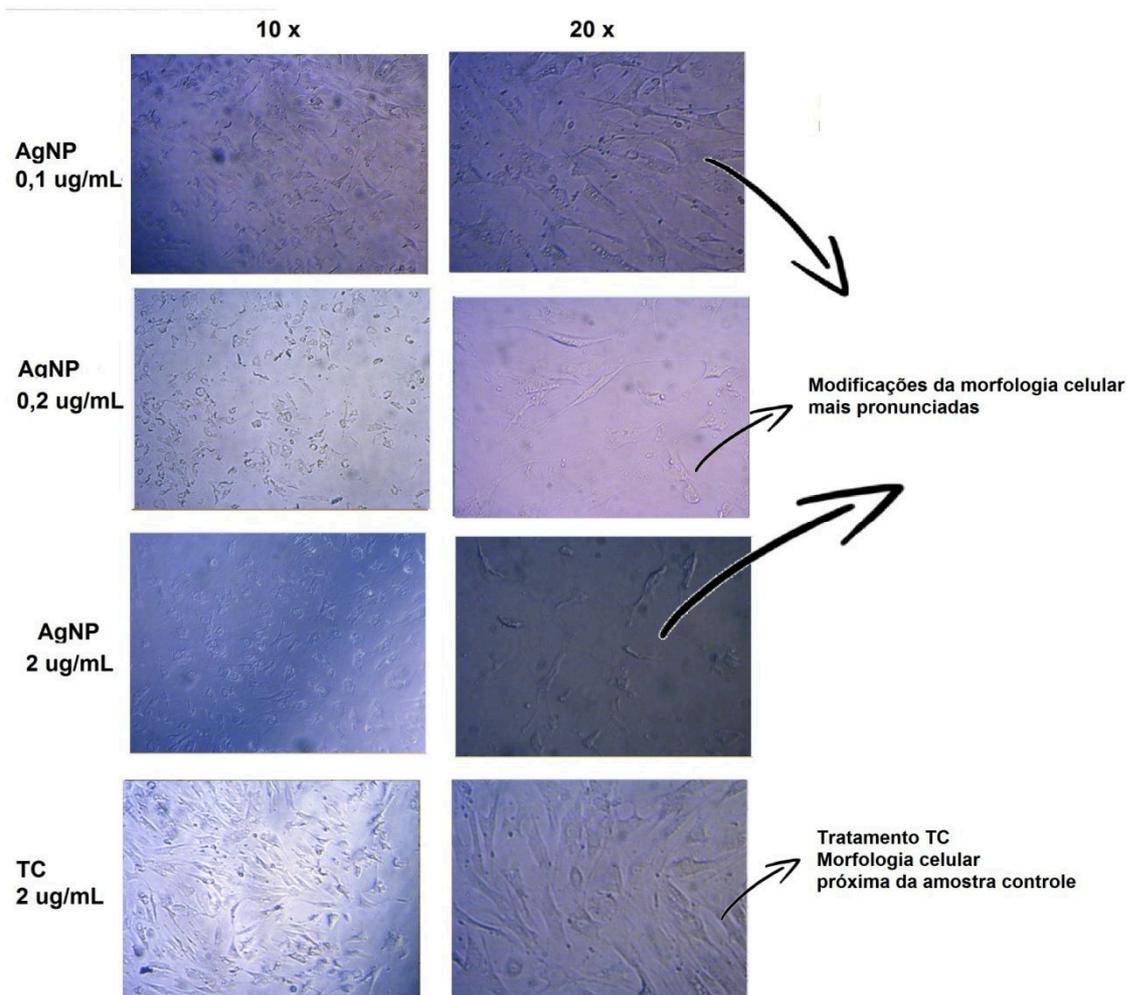


Figura 72: Fotomicrografias das células de fibroblastos bovino na presença dos tratamentos AgNP e TC



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O efeito citotóxico de AgNP é conhecido e descrito na literatura por vários autores (AHMED et al., 2017; GALANDAKOVA et al., 2016; HUANG et al., 2017; JIRAVOVA et al., 2016; NGUYEN et al., 2016). Dentre essas pesquisas várias são direcionadas na compreensão dos mecanismos de citotoxicidade das AgNP tanto em ensaios *in vitro* quanto em ensaios *in vivo*. O mecanismo mais aceito para a citotoxicidade das AgNP é devido a sua elevada capacidade de promover a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que produz processos inflamatórios mediados pelos fatores de transcrição NFkB e AP1 o que leva a morte celular por apoptose(DAI et al., 2016).

É conhecido ainda, que os efeitos citotóxicos são influenciados por vários parâmetros, com destaque para o tamanho e forma das nanoestruturas, o agente

estabilizante, a concentração utilizada, pH, carga superficial e estado de agregação das AgNP(AHMED et al., 2017).

O efeito citotóxico de AgNP combinadas com QUIT foi reportado por Freire *et al.* Foram propostas sínteses de diferentes tamanhos e formas utilizando-se os redutores borohidreto de sódio e ácido ascórbico. Os autores mostraram através dos ensaios de artemia salina e MTT que as AgNP recobertas com QUIT foram pouco tóxicas frente as células de macrófagos de camundongos (FREIRE et al., 2016).

Por outro lado, o efeito de citotoxicidade para a combinação de AgNP, QUIT e antibiótico ainda não foi reportado na literatura, o que torna o conhecimento dos efeitos de citotoxicidade das AgNP+QUIT+TC de extrema relevância para futuras aplicações dessas AgNP.

Assim como o observado na literatura foi encontrado uma forte relação de dose-dependência na ocorrência de citotoxicidade das AgNP. No presente estudo, foi observado que altas concentrações de AgNP afetam de forma significativa a viabilidade celular das células de fibroblastos bovinos o que está de acordo com os trabalhos anteriores utilizando outros tipos celulares(DAI et al., 2016; GALANDAKOVA et al., 2016)

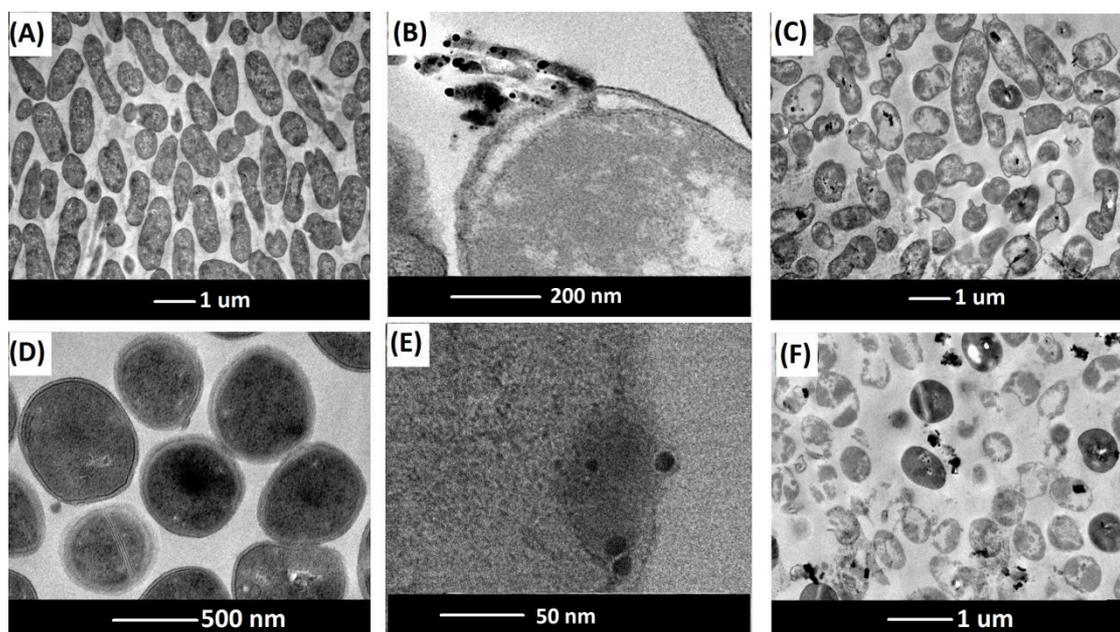
Foi observado que a utilização da QUIT como agente estabilizante aumentou a biocompatibilidade para as células de fibroblastos bovinos quando comparadas com as AgNP recobertas com citrato, o que está de acordo com o trabalho publicado por Ahmed *et al.*(AHMED et al., 2017).

Foram observadas ainda que as combinações de AgNP+QUIT apresentam uma baixa citotoxicidade para as concentrações de 0,2 e 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  o que também foi obtido por Freire *et al.*(FREIRE et al., 2016).

#### 4.6.2. Estudo das interações das AgNPs em células bacterianas

A interação das AgNP frente as bactérias *K. pneumoniae* e *S. aureus* foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para este estudo foram utilizadas as sínteses do colóide B. As imagens TEM das bactérias *K. pneumoniae* e *S. aureus* são apresentadas na Figura 73. Essas micrografias mostram que as AgNP interagem com a parede e / ou membrana celular tanto da bactéria Gram-positiva (*S.aureus*) quanto da bactéria Gram-negativa (*K.pneumoniae*), o que promove mudanças na morfologia da parede celular induzidas pela presença das AgNP.

Figura 73: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da bactéria *K. pneumoniae* na ausência (A) e na presença (B) e (C) das AgNPs; e da bactéria *S. aureus* na ausência (D) e na presença (E) e (F) das AgNPs



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

## 5. CONCLUSÕES

A adsorção do TI sobre a superfície metálica da prata preservou a estabilidade do coloide de prata quando os espectros UV-VIS foram obtidos imediatamente após mistura. Após 3 horas de adsorção ocorreu agregação da suspensão com deslocamento da banda LSPR para a região do vermelho. Os espectros SERS mostraram que o antimicrobiano TI adsorveu sobre a superfície metálica da prata através do grupo nitro. Na presença do 2-mercaptoetanol o anel imidazólico ficou em ângulo em relação a superfície metálica da prata, enquanto que na presença do HCl o par iônico envolvendo o nitrogênio N3 protonado e o íon cloreto coadsorvido, levou a uma geometria perpendicular do anel imidazólico em relação a superfície metálica da prata.

Os espectros UV-VIS do MT mostraram comportamento muito similar que o observado para o TI, sendo isto devido a estes dois antimicrobianos serem da classe do nitroimidazol, ou seja, apresentam o mesmo grupo cromóforo. Os espectros SERS mostraram que o antibiótico MT adsorveu sobre a superfície metálica da prata através do grupo nitro com o anel imidazólico perpendicular em relação a superfície metálica da prata. O modificador de superfície 2-mercaptoetanol perturbou a interação com a superfície da prata e a presença do PVA levou a um distanciamento ainda maior do MT em relação a superfície metálica.

A adsorção do AZ sobre a superfície metálica da prata ocorreu sem a perda da estabilidade do coloide de prata. Os espectros SERS mostraram que o antibiótico AZ adsorveu na forma aniônica ( $AZ^{2-}$ ) sobre a superfície metálica da prata através do carboxilato com o anel tiazólico próximo da superfície. Na presença do 2-mercaptoetanol, o anel tiazólico ficou em ângulo em relação a superfície metálica da prata, devido a formação de ligações de hidrogênio entre  $AZ^{2-}$  e o 2-mercaptoetanol.

Os espectros SERRS e RR do antibiótico RP, obtidos utilizando linha laser de comprimento de onda em 532 nm, apresentaram algumas similaridades na ausência do 2-mercaptoetanol, mas a modificação da superfície da prata com esta mercaptana promoveu mudanças significativas no padrão espectral, que foram atribuídas a alta influência da superfície metálica sobre a estrutura eletrônica do sistema  $\pi$ -conjugado.

O espectro SERS da RP adsorvida em AgNP, obtido utilizando radiação excitante de comprimento de onda em 633 nm, mostrou que o efeito Raman pré-ressonante teve uma pequena influência no padrão espectral SERS na ausência e

presença do 2-mercaptoetanol. No entanto, tal efeito foi relevante quando íon cloreto foi utilizado como modificador de superfície, devido a adsorção da RP ocorrer via mecanismo de par iônico através do grupo amônio protonado. Quando o espectro SERS foi obtido utilizando-se AuNP e excitação em 633 nm, o espectro SERS da RP mostrou mais influência de efeito Raman pré-ressonante, a qual foi minimizada na presença do 2-mercaptoetanol coadsorvido.

O espectro SERS da RP adsorvida sobre AuNP obtido utilizando-se linha laser de comprimento de onda em 1064 nm, não mostrou mudanças significativas no padrão espectral SERS na ausência e presença do 2-mercaptoetanol, pois este não modifica o sítio molecular envolvido na interação com a superfície metálica, agindo simplesmente como um espaçador, que mostra-se relevante na alteração dos padrões espectrais SERS apenas quando o efeito RR está presente.

A espectroscopia SERS permitiu estudar os sítios de interação dos antimicrobianos TI, MT, AZ, RP e TC adsorvidos sobre superfícies metálicas de ouro ou prata. O conhecimento do sítio que está envolvido na adsorção é importante para viabilizar futuras aplicações em sistemas de carreamento de fármacos.

Os ensaios de citotoxicidade das AgNP+QUIT+TC, AgNP+QUIT, AgNP, TC e QUIT mostraram que a QUIT e a TC são pouco tóxicas frente as células de fibroblastos bovinos. O uso das concentrações finais 2, 0,2 e 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para os tratamentos utilizados mostraram viabilidade celular das células de fibroblastos quando foi utilizado o ensaio de MTT. Diferença significativa entre a amostra controle e os tratamento AgNP na concentração 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi observado para o tempo de interação de 24 h, enquanto que para o tempo de 48 h observou-se diferença significativa para os tratamentos de AgNP+QUIT e AgNP na concentração de 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As imagens de microscopia ótica dos tratamentos utilizados mostraram que as AgNP+QUIT+TC, AgNP+QUIT, AgNP modificam de forma significativa a morfologia das células de fibroblastos bovinos. No entanto, essa modificação não está diretamente relacionada a processo de morte celular mostrando valores de viabilidade altos nos ensaios de MTT.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, K. B. R. et al. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. **Toxicology in Vitro**, v. 38, p. 179-192, Feb 2017.
- ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalous intense Raman-spectra of pyridine at a silver electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 15, p. 5215-5217, 1977.
- ALEXANDER, J. W. History of the Medical Use of Silver. **Surgical Infections**, v. 10, n. 3, p. 289-292, Jun 2009.
- ANDRADE, G. F. S.; BROLO, A. G.; TEMPERINI, M. L. A. Comparison of SERS performances of Co and Ni ultrathin films over silver to electrochemically activated Co and Ni electrodes. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 39, p. 15348-15355, Oct 2008.
- ARJUNAN, V. et al. A new look into the quantum chemical and spectroscopic investigations of 5-chloro-1-methyl-4-nitroimidazole. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 125, p. 160-174, May 2014.
- AROCA, R. **Surface Enhanced Vibrational Spectroscopy**. Ontario, Canada: John Wiley and Sons, 2006.
- ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 2, p. 151-165, Jan 2012.
- BADR, Y.; MAHMOUD, M. A. Enhancement of the optical properties of poly vinyl alcohol by doping with silver nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 6, p. 3608-3614, Mar 2006.
- BISWAS, N. et al. Adsorption of Methimazole on Silver Nanoparticles: FTIR, Raman, and Surface-Enhanced Raman Scattering Study Aided by Density Functional Theory. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 17, p. 7091-7100, Apr 2009.
- BOCA-FARCAU, S. et al. Folic Acid-Conjugated, SERS-Labeled Silver Nanotriangles for Multimodal Detection and Targeted Photothermal Treatment on Human Ovarian Cancer Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 391-399, Feb 2014.
- BUKOWSKA, J.; KUDELSKI, A.; JACKOWSKA, K. The use of Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) to probe the interaction of imidazole with the silver electrode surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 309, n. 1-2, p. 251-261, Jul 1991.
- CARTER, D. A.; PEMBERTON, J. E. Surface enhanced Raman scattering of the acid base forms of imidazole on Ag. **Langmuir**, v. 8, n. 4, p. 1218-1225, Apr 1992.
- CASTELLANO, J. J. et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. **International Wound Journal**, v. 4, n. 2, p. 114-122, 2007.
- CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 1-2, p. 1-12, Jan 2002.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-+, Jun 2001.

COBLEY, C. M. et al. Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 44-56, 2011.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 8, p. 2110-&, 1972.

CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, v. 75, p. 790-798, 1979.

DAI, X. M. et al. Functional Silver Nanoparticle as a Benign Antimicrobial Agent That Eradicates Antibiotic-Resistant Bacteria and Promotes Wound Healing. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 39, p. 25798-25807, Oct 2016.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6640-6645, Jun 2000.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-+, Sep 2010.

DE FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A.; SALA, O. Twenty years of SERS. **Quimica Nova**, v. 22, n. 4, p. 541-552, Jul-Aug 1999.

DENG, H. et al. Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 16, p. 8840-8848, Aug 2016.

DUNN, K.; EDWARDS-JONES, V. The role of Acticoat™ with nanocrystalline silver in the management of burns. **Burns**, v. 30, p. S1-S9, 2004/07/01 2004.

DYKMAN, L. A.; KHLEBTSOV, N. G. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. **Acta Naturae**, v. 3, n. 2, p. 34-55, Apr-Jun 2011.

FABRICIOVA, G. et al. Adsorption of the anthraquinone drug parietin on silver nanoparticles: A SERS and fluorescence study. **Vibrational Spectroscopy**, v. 63, p. 477-484, 2012.

FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 147, p. 145-181, 1857.

FENG, Q. L. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 4, p. 662-668, Dec 2000.

FILGUEIRAS, A. L. **Estudo in vitro do potencial antibacteriano de nanopartículas de prata, associadas à quitosana e antibióticos e das interações com a superfície metálica por espectroscopia Raman intensificada por superfície.** 2013. 115p. Dissertação de mestrado. Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

FILGUEIRAS, A. L. et al. Adsorption study of antibiotics on silver nanoparticle surfaces by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 979-985, Feb 2015.

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

FONSECA, B. G. D. **Estudo da Interação entre Peptídeos Derivados de Triptofano e Nanopartículas Metálicas.** 2016. 117p. Dissertação de mestrado Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016

FREESTONE, I. et al. The Lycurgus Cup - A Roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 270-277, 2007.

FREIRE, P. L. L. et al. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan - silver nanoparticles - fluoride nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 896-903, Dec 2016.

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **nature physical science**, v. 241, p. 20-22, 1973.

FROST, H. M. Tetracycline based histological analysis of bone remodeling. **Calcified Tissue Research**, v. 3, n. 3, p. 211-&, 1969.

GALANDAKOVA, A. et al. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 9, p. 946-957, Sep 2016.

GIUSTARINI, D. et al. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 46, n. 5-6, p. 241-281, 2009.

GRAHAM, D. Y. et al. Effect of treatment of Helicobacter pylori infection on the long term recurrence og gastric or duodenal ulcer. **Annals of Internal Medicine**, v. 116, n. 9, p. 705-708, May 1992.

HAN, C. et al. Detection of metronidazole and ronidazole from environmental Samples by surface enhanced Raman spectroscopy. **Talanta**, v. 128, p. 293-298, 2014.

HAO, E.; SCHATZ, G. C. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. **Journal of Chemical Physics**, v. 120, n. 1, p. 357-366, Jan 2004.

HAY, P. J.; WADT, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. **The Journal of Chemical Physics**, v. 82, n. 1, p. 299-310, 1985.

HE, L. L. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with dendritic silver nanosubstrate for detection of restricted antibiotics. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, n. 7, p. 739-744, Jul 2010.

HE, R. et al. Preparation of polychrome silver nanoparticles in different solvents. **Journal of Materials Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 3783-3786, 2002.

HIDI, I. J. et al. Droplet based microfluidics: spectroscopic characterization of levofloxacin and its SERS detection. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 33, p. 21236-21242, 2015.

HONG, S.; LI, X. One step surface modification of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy. **Applied Surface Science**, v. 287, p. 318-322, Dec 2013.

HOWES, B. D. et al. The influence of pH and anions on the adsorption mechanism of rifampicin on silver colloids. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 38, n. 7, p. 859-864, Jul 2007.

HOWES, B. D. et al. Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of rifamycins on silver nanoparticles: insight into their adsorption mechanisms. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 37, n. 9, p. 900-909, Sep 2006.

HUANG, Z. Z. et al. Toxicity mechanisms and synergies of silver nanoparticles in 2,4-dichlorophenol degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 37-46, Jan 2017.

HUTTER, E.; FENDLER, J. H. Exploitation of localized surface plasmon resonance. **Advanced Materials**, v. 16, n. 19, p. 1685-1706, Oct 2004.

ILIESCU, T.; BAI, M.; PAVEL, I. Raman and SERS investigations of potassium benzylpenicillin. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 37, n. 1-3, p. 318-325, Jan-Mar 2006.

IP, M. et al. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 59-63, Jan 2006.

ITOH, T. et al. Experimental demonstration of the electromagnetic mechanism underlying surface enhanced Raman scattering using single nanoparticle spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry**, v. 219, n. 2-3, p. 167-179, Apr 2011.

JAYAKUMAR, R. et al. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials-A short review. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 227-232, Sep 2010.

JEANMAIRE, D. L.; VANDUYNE, R. P. Surface Raman spectroelectrochemistry. 1. Heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on silver electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 1-20, 1977.

Ji, W.; YAO, W. R. Rapid surface enhanced Raman scattering detection method for chloramphenicol residues. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 144, p. 125-130, Jun 2015.

JIN, D. et al. SERS detection of expired tetracycline hydrochloride with an optical fiber nano-probe. **Analytical Methods**, v. 7, n. 4, p. 1307-1312, 2015.

JIRAVOVA, J. et al. The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 96, p. 50-61, Oct 2016.

KHAN, S. T.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 146, p. 70-83, Oct 2016.

KNEIPP, K. et al. Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 10, p. 2957-+, Oct 1999.

KONOP, M. et al. Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview. **Journal of Nanomaterials**, p. 10, 2016.

KORA, A. J.; RASTOGI, L. Enhancement of Antibacterial Activity of Capped Silver Nanoparticles in Combination with Antibiotics, on Model Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2013.

KUDELSKI, A. Chemisorption of 2-mercaptoethanol on silver, copper, and gold: Direct Raman evidence of acid-induced changes in adsorption/desorption equilibria. **Langmuir**, v. 19, n. 9, p. 3805-3813, Apr 2003.

LE OUAY, B.; STELLACCI, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. **Nano Today**, v. 10, n. 3, p. 339-354, Jun 2015.

LEE, A. et al. Probing Dynamic Generation of Hot-Spots in Self-Assembled Chains of Gold Nanorods by Surface-Enhanced Raman Scattering. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 19, p. 7563-7570, May 2011.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391-3395, 1982.

LE RU, E.; ETCHEGOIN, P. **Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy**. Amsterdam: Elsevier, 2009.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. S122-S129, Dec 2004.

LEYPOLD, C. F. et al. Tetracycline and derivatives - assignment of IR and Raman spectra via DFT calculations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 5, n. 6, p. 1149-1157, 2003.

LI, R. et al. Improved surface-enhanced Raman scattering on micro-scale Au hollow spheres: Synthesis and application in detecting tetracycline. **Analyst**, v. 136, n. 12, p. 2527-2532, 2011.

LIU, R. et al. NIR-SERS studies of DNA and DNA bases attached on polyvinyl alcohol (PVA) protected silver grass-like nanostructures. **Vibrational Spectroscopy**, v. 67, p. 71-79, 2013.

LOMBARDI, J. R.; BIRKE, R. L. The theory of surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Chemical Physics**, v. 136, n. 14, p. 11, Apr 2012.

LOO, B. H. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of imidazole adsorbed on electrode and colloidal surfaces of Cu, Ag, and Au. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 37, n. 1-3, p. 299-304, Jan-Mar 2006.

MADHUMATHI, K. et al. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 21, n. 2, p. 807-813, Feb 2010.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531-1551, Jun 2010.

MERCHANT, F.; CARPENTER, T. Blue-Gray Discoloration of the Skin. **American Family Physician**, v. 84, n. 7, p. 821-822, Oct 2011.

MIKAC, L. et al. Synthesis and characterization of silver colloidal nanoparticles with different coatings for SERS application. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 12, p. 2748, 2014.

MIYACHI, Y. Potential antioxidant mechanism of action for metronidazole: Implications for rosacea management. **Advances in Therapy**, v. 18, n. 6, p. 237-243, Nov-Dec 2001.

M.J. FRISCH, G.W. TRUCKS, H.B. SCHLEGEL, G.E. SCUSERIA, M.A. ROBB, J.R. CHEESEMAN, G. SCALMANI, V. BARONE, B. MENNUCCI, G.A. PETERSSON, H. NAKATSUJI, M. CARICATO, X. LI, H.P. HRATCHIAN, A.F. IZMAYLOV, J. BLOINO, G. ZHENG, J.L. SONNENBERG, M. HADA, M. EHARA, K. TOYOTA, R. FUKUDA, J. HASEGAWA, M. ISHIDA, T. NAKAJIMA, Y. HONDA, O. KITAO, H. NAKAI, T. VREVEN, J.A. MONTGOMERY JR., J.E. PERALTA, F. OGLIARO, M. BEARPARK, J.J. HEYD, E. BROTHERS, K.N. KUDIN, V.N. STAROVEROV, R. KOBAYASHI, J. NORMAND, K. RAGHAVACHARI, A. RENDELL, J.C. BURANT, S.S. IYENGAR, J. TOMASI, M. COSSI, N. REGA, J.M. MILLAM, M. KLENE, J.E. KNOX, J.B. CROSS, V. BAKKEN, C. ADAMO, J. JARAMILLO, R. GOMPERTS, R.E. STRATMANN, O. YAZYEV, A.J. AUSTIN, R. CAMMI, C. POMELLI, J.W. OCHTERSKI, R.L. MARTIN, K. MOROKUMA, V.G. ZAKRZEWSKI, G.A. VOTH, P. SALVADOR, J.J. DANNENBERG, S. DAPPRICH, A.D. DANIELS, Ö. FARKAS, J.B. FORESMAN, J.V. ORTIZ, J. CIOSLOWSKI, D.J. FOX, Gaussian 09, Revision A. 02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.

MORONES-RAMIREZ, J. R. et al. Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 190, p. 11, Jun 2013.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, Oct 2005.

MORTON, S. M.; SILVERSTEIN, D. W.; JENSEN, L. Theoretical Studies of Plasmonics using Electronic Structure Methods. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 6, p. 3962-3994, Jun 2011.

MOSKOVITS, M. Surface selection rules. **Journal of Chemical Physics**, v. 77, n. 9, p. 4408-4416, 1982.

\_\_\_\_\_. Surface enhanced spectroscopy. **Reviews of Modern Physics**, v. 57, n. 3, p. 783-826, 1985.

\_\_\_\_\_. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 6-7, p. 485-496, Jun-Jul 2005.

MOSKOVITS, M.; SUH, J. S. Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy - calculations and application to surface enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 23, p. 5526-5530, 1984 1984.

MURPHY, A. et al. Silver nanoparticles induce pro-inflammatory gene expression and inflammasome activation in human monocytes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 10, p. 1311-1320, Oct 2016.

NAHA, P. C.; CHHOUR, P.; CORMODE, D. P. Systematic in vitro toxicological screening of gold nanoparticles designed for nanomedicine applications. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1445-1453, Oct 2015.

NEU, H. C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1064-1073, Aug 1992.

NGUYEN, K. C. et al. Toxicological evaluation of representative silver nanoparticles in macrophages and epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 163-173, Jun 2016.

NIE, S. M.; EMERY, S. R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. **Science**, v. 275, n. 5303, p. 1102-1106, Feb 1997.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 4, p. 1177-1183, Feb 2011.

ORENDORFF, C. J. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of self-assembled monolayers: Sandwich architecture and nanoparticle shape dependence. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 10, p. 3261-3266, May 2005.

OTTO, A. The 'chemical' (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 6-7, p. 497-509, Jun-Jul 2005.

OTTO, A. The 'chemical' (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 6-7, p. 497-509, 2005.

PAGE FAULK, W.; MALCOLM TAYLOR, G. Communication to the editors. **Immunochemistry**, v. 8, n. 11, p. 1081-1083, 1971/11/01 1971.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, Mar 2007.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-+, Oct 2005.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. ASPECTS OF BIOACTIVITY AND TOXICITY OF NITROCOMPOUNDS. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

- PELTON, M.; AIZPURUA, J.; BRYANT, G. Metal-nanoparticle plasmonics. **Laser & Photonics Reviews**, v. 2, n. 3, p. 136-159, Jun 2008.
- PERGOLESE, B.; MUNIZ-MIRANDA, M.; BIGOTTO, A. Surface enhanced Raman scattering investigation of the halide anion effect on the adsorption of 1,2,3-triazole on silver and gold colloidal nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 19, p. 9665-9671, May 2005.
- PLOSKER, G. L. Aztreonam Lysine for Inhalation Solution In Cystic Fibrosis. **Drugs**, v. 70, n. 14, p. 1843-1855, 2010.
- POOLE, K. Resistance to beta-lactam antibiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 17, p. 2200-2223, Sep 2004.
- POTARA, M.; GABUDEAN, A. M.; ASTILEAN, S. Solution-phase, dual LSPR-SERS plasmonic sensors of high sensitivity and stability based on chitosan-coated anisotropic silver nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3625-3633, 2011.
- POWER, A. C.; BETTS, A. J.; CASSIDY, J. F. Non aggregated colloidal silver nanoparticles for surface enhanced resonance Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 136, n. 13, p. 2794-2801, 2011.
- QIAN, X. et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. **Nat Biotech**, v. 26, n. 1, p. 83-90, 2008.
- RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, Nov-Dec 2003.
- RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new type of secondary radiation (Reprinted from Nature, vol 121, pg 501-502, 1928). **Current Science**, v. 74, n. 4, p. 381-381, Feb 1998.
- RUBIM, J. C. et al. Contribution of resonance Raman scattering to the surface Raman effect on silver electrode surface. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 43, p. 15765-15774, Oct 1995.
- RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B. 7 Antimicrobial Activity and Action of Silver. In: ELLIS, G. P. e LUSCOMBE, D. K. (Ed.). **Progress in Medicinal Chemistry**: Elsevier, v. Volume 31, 1994. p.351-370. ISBN 0079-6468.
- SALA, O. I-2 - A pedagogical molecule. **Quimica Nova**, v. 31, n. 4, p. 914-920, 2008.
- SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e Infravermelho**. São Paulo: Unesp, 2008.
- ŞANLI, S. et al. Determination of Dissociation Constants of Some Antifungal Drugs by Two Different Methods at 298 K. **Journal of Solution Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1976-1987, 2013.
- SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 168-171, Jun 2007.
- SHALAEVA, M. et al. Measurement of dissociation constants (pKa values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2581-2606, 2008.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1-2, p. 83-96, Jan 2009.

SHI, Z. L. et al. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 27, n. 11, p. 2440-2449, Apr 2006.

SI, M. Z.; KANG, Y. P.; ZHANG, Z. G. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of Methyl Orange in Ag colloids prepared by electrolysis method. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 11, p. 6007-6010, 2009.

SINGH, R. et al. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4277-4290, 2013.

SONG, J. B.; ZHOU, J. J.; DUAN, H. W. Self-Assembled Plasmonic Vesicles of SERS-Encoded Amphiphilic Gold Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Traceable Intracellular Drug Delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 32, p. 13458-13469, Aug 2012.

STELZLE, M.; WEISSMULLER, G.; SACKMANN, E. ON THE APPLICATION OF SUPPORTED BILAYERS AS RECEPTIVE LAYERS FOR BIOSENSORS WITH ELECTRICAL DETECTION. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 12, p. 2974-2981, Mar 1993.

STEPHENS, P. J. et al. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 45, p. 11623-11627, 1994.

TARABARA, V. V.; NABIEV, I. R.; FEOFANOV, A. V. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of mercaptoethanol monolayer assemblies on silver citrate hydrosol. Preparation and characterization of modified hydrosol as a SERS-active substrate. **Langmuir**, v. 14, n. 5, p. 1092-1098, Mar 1998.

TATARKIEWICZ, J.; STANISZEWSKA, A.; BUJALSKA-ZADRONY, M. New agents approved for treatment of acute staphylococcal skin infections. **Archives of Medical Science**, v. 12, n. 6, p. 1327-1336, Dec 2016.

TIAN, F. R. et al. Gold nanostars for efficient in vitro and in vivo real-time SERS detection and drug delivery via plasmonic-tunable Raman/FTIR imaging. **Biomaterials**, v. 106, p. 87-97, Nov 2016.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, n. 11, p. 55-&, 1951.

USMAN, A. et al. Chitin and chitosan based polyurethanes: A review of recent advances and prospective biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 630-645, May 2016.

VOLKAN, M.; STOKES, D. L.; VO-DINH, T. Surface-Enhanced Raman of Dopamine and Neurotransmitters Using Sol-Gel Substrates and Polymer-Coated Fiber-Optic Probes. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 12, p. 1842-1848, 2000.

VOOGD, C. E.; VANDERSTEL, J. J.; JACOBS, J. MUTAGENIC ACTION OF NITROIMIDAZOLES .3. TINIDAZOLE, IPRONIDAZOLE, PANIDAZOLE AND ORNIDAZOLE. **Mutation Research**, v. 48, n. 2, p. 155-161, 1977.

WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. In: (Ed.). **Annual Review of Physical Chemistry**. Palo Alto: Annual Reviews, v.58, p.267-297, 2007.

XU, Y. Q. et al. Turning Tryptophanase into Odor-Generating Biosensors. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 53, n. 10, p. 2620-2622, Mar 2014.

XUE, G.; DAI, Q. P.; JIANG, S. G. Chemical reactions of imidazole with metallic silver studied by the use of SERS and XPS techniques. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 8, p. 2393-2395, Apr 1988.

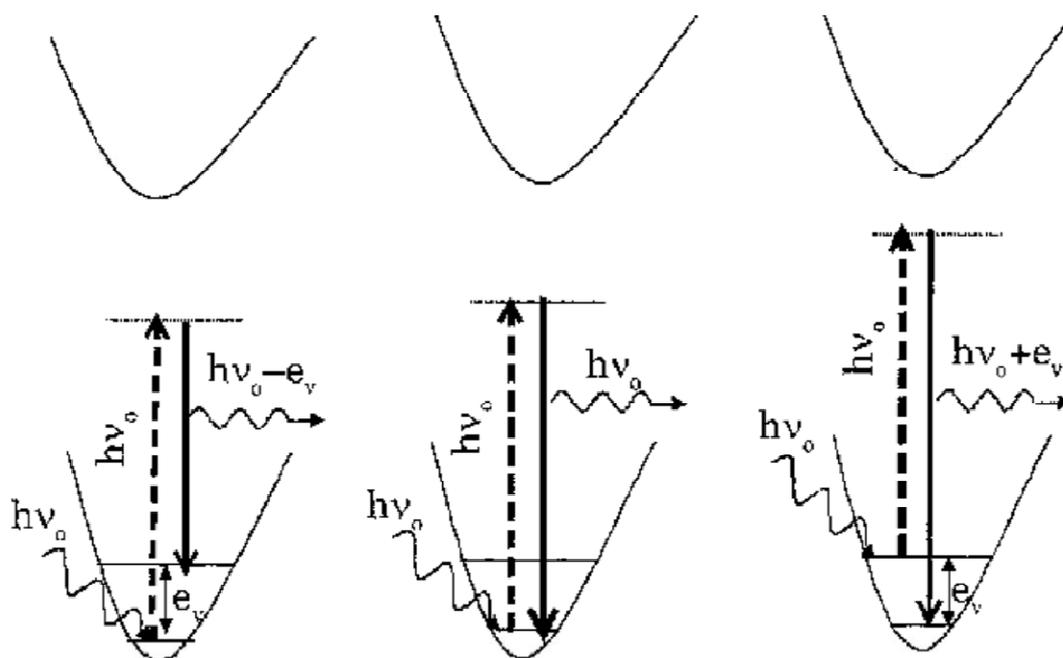
ZHAO, J. H. et al. Rapid Detection of Tetracycline Residues in Duck Meat Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy. **Journal of Spectroscopy**, p. 6, 2016.

## ANEXO 1

### Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman assim como a espectroscopia no infravermelho permite o estudo das transições vibracionais de uma determinada molécula. O efeito Raman foi descoberto em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman, e consiste na observação do espalhamento inelástico de luz após uma radiação monocromática atingir uma determinada amostra (RAMAN; KRISHNAN, 1998). O fenômeno do espalhamento é gerado a partir de uma fonte de excitação monocromática, com energia  $h\nu_0$ , que ao atingir uma molécula leva esta para um estado de energia intermediária (virtual) que não é um estado estacionário da molécula. Esta pode voltar para o mesmo nível de energia inicial, com o fóton espalhado com mesma energia do fóton incidente, o que caracteriza o espalhamento elástico, conhecido como espalhamento Rayleigh, ou decair para um estado vibracional excitado de energia  $e_v$ , com o fóton com energia  $h\nu_0 - e_v$ , menor que a energia do fóton incidente, conhecido como espalhamento Stokes. No espalhamento Raman anti-stokes o fóton encontra a molécula já num estado excitado e após interação a molécula decai para o estado fundamental, e neste caso o fóton é espalhado com energia  $h\nu_0 + e_v$ . Os mecanismos do espalhamento podem ser representados pelo seguinte esquema (SALA, 2008):

**Figura 74: Mecanismos do espalhamento Raman**



Fonte: ADAPTADO DE SALA, 2008

Tanto a espectroscopia Raman quanto a espectroscopia no infravermelho fornecem informações sobre a estrutura, a conformação e o ambiente químico de uma determinada espécie molecular. No entanto, os fenômenos envolvidos são distintos, a espectroscopia no infravermelho envolve a absorção de fótons em ressonância com as transições vibracionais, enquanto que a espectroscopia Raman envolve o espalhamento de fótons de forma inelástica, o que leva a regras de seleção distintas (MCCREERY,2000).

O campo elétrico induzido por um momento de dipolo,  $P$ , pode ser decomposto em componentes que oscilam com a mesma frequência do campo elétrico incidente  $E$ , além de outras componentes cujas frequências são moduladas pelas frequências vibracionais da molécula, dado pela seguinte equação:

$$P = \alpha E \quad (8)$$

A polarizabilidade pode ser entendida como a facilidade da molécula deformar a nuvem eletrônica na presença de um campo elétrico (SALA, 2008).

A polarizabilidade,  $\alpha$  pode ser desenvolvida em série de Taylor em função da coordenada interna  $q$ :

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \dots \quad (9)$$

Os termos de ordem mais alta podem ser desprezados, sendo isto devido a pequena variação da coordenada  $q$ .

A coordenada  $q$  e o campo elétrico  $E$  são descritos por:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \text{ e } E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (10)$$

Onde  $\nu_v$  e  $\nu_0$  são as frequências vibracional e da radiação incidente. Se substituirmos as equações 10 e 11 na equação (9), o momento de dipolo induzido ficará:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_v t) \quad (11)$$

$$\text{Como } \cos(a) \cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a+b) + \cos(a-b)]$$

$$\begin{aligned} P = & \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \{ \cos [2\pi(\nu_0 + \nu_s)] t \\ & + \cos [2\pi(\nu_0 - \nu_s)] t \} \quad (12) \end{aligned}$$

O primeiro termo é relativo ao espalhamento Rayleigh por conter somente a frequência da radiação excitante. No segundo termo a frequência da radiação espalhada  $(\nu_0 - \nu_s)$  é relativa ao espalhamento Raman Stokes e  $(\nu_0 + \nu_s)$  é relativo ao espalhamento Raman anti-Stokes. Para que ocorra atividade Raman deve ocorrer variação da polarizabilidade com a coordenada  $q$ , ou seja,  $(d\alpha/dq)_0 \neq 0$  (SALA, 2008).

Classicamente a intensidade das bandas Raman Stokes e anti Stokes deveriam ter a mesma intensidade. No entanto, observa-se que as bandas Raman na região Stokes são mais intensas que as bandas Raman na região anti-Stokes. Para explicar este comportamento precisamos recorrer ao modelo quântico (SALA, 2008).

O momento de transição induzido pode ser escrito de acordo com a seguinte equação:

$$P_{mn} = E(\alpha_{ij})_{mn} \quad (13)$$

Onde  $\alpha_{ij}$  são as componentes do tensor de polarizabilidade

A relação entre os componentes do momento de dipolo induzido e os componentes do campo elétrico são dadas pelas seguintes equações:

$$\begin{aligned}
 P_x &= \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \\
 P_y &= \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z \\
 P_z &= \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z
 \end{aligned} \quad (14)$$

A integral do momento de transição é escrita como:

$$(a_{ij})_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau \quad (15)$$

Na transição Raman entre os estados m e n devem ser considerados os componentes  $(\alpha_{ij})_{mn}$ , onde i e j são x,y ou z. Para haver atividade no Raman pelo menos um dos componentes da integral do momento de transição deve ser diferente de zero (SALA, 2008).

Considerando o desenvolvimento em série de Taylor

$$(a_{ij})_{mn} = (\alpha_{ij})_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left( \frac{d\alpha_{ij}}{dq} \right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau \quad (16)$$

Se os estados vibracionais m e n forem diferentes a primeira integral do segundo membro é igual a zero pela ortogonalidade entre  $\psi_m$  e  $\psi_n$ . Se os estados vibracionais m e n forem iguais o primeiro termo corresponde ao espalhamento Rayleigh. Para o segundo termo ser diferente de zero, é necessário que sejam satisfeitas as condições:

1)  $\left( \frac{d\alpha_{ij}}{dq} \right)_0 \neq 0$  uma das componentes do tensor de polarizabilidade deve variar com a vibração

2)  $\int \psi_m q \psi_n d\tau$  que rege a regra de seleção, ou seja  $\Delta v = \pm 1$

A intensidade Raman de acordo com essas equações irá depender da probabilidade de transição, ou seja, do quadrado do tensor de polarizabilidade e da quarta frequência da radiação espalhada dada pela seguinte equação:

$$I_{mn} = \left( \frac{16\pi^2}{9c^4} \right) I_0 \nu^4 \sum_i \sum_j |(a_{ij})_{mn}|^2 \quad (17)$$

Sendo  $I_0$  a intensidade da radiação excitante e  $\nu$  a frequência da radiação espalhada (SALA, 2008).

Dentre todos os fenômenos que podem ocorrer em uma molécula, o fenômeno do espalhamento Raman apresenta uma baixa seção de choque,  $10^{-30}$ - $10^{-25}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$ , ou seja há uma ineficiência intrínseca do processo, o que leva a limitações da técnica, ocorrendo a necessidade de se utilizar altas concentrações da

amostra para a obtenção de um espectro em solução (KNEIPP et al., 1999). Em virtude dessa baixa seção de choque a técnica de espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS) surge como uma alternativa para o estudo de monocamadas adsorvidas em superfícies metálicas de Ag, Au e Cu (DE FARIA et al., 1999).

## ANEXO 2

### Produção científica

#### Pedido de patente

**FILGUEIRAS, A. L.; DINIZ, C. G. ; SILVA, V. L. ; LOPES, M. .** Composição envolvendo nanopartículas de prata, quitosana e antibióticos com potencial antibacteriano combinado. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI0273357, título: "Composição envolvendo nanopartículas de prata, quitosana e antibióticos com potencial antibacteriano combinado" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 05/10/2012; Depósito PCT: 26/10/2012. Instituições financiadora(s): FAPEMIG; UFJF

#### Artigos completos publicados em periódicos

**FILGUEIRAS, ALINE LUCIANO; LIMA, FRANCIELY RUFINO A. ; DE CARVALHO, DHIENIFFER FERREIRA ; MEIRELLES, MARCELA ARANTES ; PASCHOAL, DIEGO ; DOS SANTOS, HÉLIO FERREIRA ; SANCHEZ-CORTES, SANTIAGO ; SANT'ANA, ANTONIO CARLOS .** The adsorption of rifampicin on gold or silver surfaces mediated by 2-mercaptoethanol investigated by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy (Print)*, v. 86, p. 75-80, 2016

**FILGUEIRAS, ALINE LUCIANO; PASCHOAL, DIEGO ; DOS SANTOS, HÉLIO F. ; SANT'ANA, ANTONIO C. .** Adsorption study of antibiotics on silver nanoparticle surfaces by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy (Print)*, v. 136, p. 979-985, 2015.

#### Artigos completos aceitos em periódicos

**FILGUEIRAS, ALINE LUCIANO; DUTRA, TAILINE MARA FREIRE; PASCHOAL, DIEGO; DOS SANTOS, HÉLIO FERREIRA; SANT'ANA, ANTONIO CARLOS.** A SERS investigation of antimicrobials adsorption on silver nanoparticles as mediated by surface modifiers, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2017

**Trabalhos completos publicados em anais de congressos**

**FILGUEIRAS, A. L.**; PASCHOAL, D. ; LOPES, M. ; CAMPOS, M. B. ; DINIZ, C. G. ; SANTOS, H. F. ; SANT'ANA, A. C. . Estudo da interação de nanopartículas de prata com antibióticos por técnicas espectroscópicas e da ação antibacteriana in vitro destes materiais. In: VIII Workshop de Nanotecnologia Aplicada no Agronegócio, 2014, Juiz de Fora. VIII Workshop de Nanotecnologia Aplicada no Agronegócio, 2014.

**FILGUEIRAS, A. L.**; SANT'ANA, A. C. . Espectroscopia Raman intensificada por superfície do antibiótico benzilpenicilina adsorvido em colóide de prata. In: 35ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia. Responsabilidade, Ética e Progresso Social, 2012.

**FILGUEIRAS, A. L.**; AMORIN, S. ; LOPES, M. ; SILVA, V. L. ; DINIZ, C. G. ; SANT'ANA, A. C. . Estudo do efeito bactericida de nanopartículas de prata na presença de quitosana e antibióticos por ensaios biológicos e espalhamento Raman Intensificado por Superfície. In: II Enbraer, 2011, Belo Horizonte. II Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2011.

**FILGUEIRAS, A. L.**; CAMPOS, M. B. ; LOPES, M. ; DINIZ, C. G. ; SANT'ANNA, C. ; SANT'ANA, A. C. . Estudo do efeito antibacteriano de nanopartículas de prata combinadas com quitosana e antibióticos. In: Luz Química Ação, 2015, Águas de Lindóia. 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015.

CARVALHO, D. F. ;**FILGUEIRAS, A. L.**; PASCHOAL, D. ; ANDRADE, G. ; SANTANA, A. C. . Study of the adsorption of biomolecules on silver or gold surfaces by SERS. In: 23 International Conference on Raman Spectroscopy ICORS 2012, 2012, Bangalore. 23 International Conference on Raman Spectroscopy ICORS 2012, 2012.

SANT'ANA, A. C.;FONSECA, B.G.; **FILGUEIRAS AL.** Controlling adsorption interactions of biomolecules on silver and gold surfaces investigated by SERS

spectroscopy. In: XXV International Conference on Raman Spectroscopy, 2016. Annals of XXV International Conference on Raman Spectroscopy. Fortaleza, CE.

**FILGUEIRAS AL**; LIMA, F. R. A.; SANT'ANA, A. C.. Estudo da adsorção da rifampicina em nanopartículas de ouro por espectroscopia Raman intensificada por superfície. In: IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2015, Juiz de Fora, MG. Livro de resumos do IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman. Juiz de Fora, MG, 2015

DUTRA, T. M. F. ;**FILGUEIRAS AL**; SANT'ANA, A. C. Estudo da adsorção do antibiótico aztreonam sobre nanopartículas de prata por espectroscopia Raman intensificada por superfície. In: IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2015, Juiz de Fora MG. Livro de Resumos do IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman. Juiz de Fora, MG, 2015.

**FILGUEIRAS AL**; DUTRA, T. M. F.; PASCHOAL, D. F. S. ;SANT'ANA, A. C.. Estudo da adsorção do metronidazol e do tinidazol sobre nanopartículas de prata por espectroscopia Raman intensificada por superfície. In: IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2015, Juiz de Fora, MG. Livro de Resumos do IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman. Juiz de Fora, MG, 2015

**FILGUEIRAS AL**;CARVALHO D.F.; MEIRELLES, M.A. ; PASCHOAL, D. F. S.; SANT'ANA, A. C.. Estudo da adsorção do antibiótico rifampicina sobre nanopartículas de ouro e prata por espectroscopia Raman intensificada por superfície. In: III Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2013, Fortaleza, Ce. III Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2013.