

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

**Marcelo Santana Louzada Brasil**

**Atividade antimicrobiana da combinação de nanopartículas de prata, quitosana e  
antibióticos avaliada por ensaios de concentração inibitória mínima e  
espectroscopia SERS**

**Juiz de Fora**

**2017**

**Marcelo Santana Louzada Brasil**

**Atividade antimicrobiana da combinação de nanopartículas de prata, quitosana e antibióticos avaliada por ensaios de concentração inibitória mínima e espectroscopia SERS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós - graduação em Química, área de concentração: Físico-Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Sant'Ana

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

**Juiz de Fora**

**2017**

Dedico esta dissertação aos meus pais Venício Louzada Índio do Brasil e Efigênia Santana Louzada Índio do Brasil, ao meu orientador Antonio Carlos Sant'Ana.

## *Agradecimentos*

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

A meu orientador Prof. Antonio Carlos Sant'Ana pelo ensinamento, apoio, incentivo e amizade demonstrada durante esses anos.

A meu coorientador Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz pelos ensinamentos, apoio, incentivo.

Aos Prof. Dr. Hélio Ferreira dos Santos e Prof. Dr. Diego Paschoal (UFRJ), pelos cálculos quânticos da benzilpenicilina.

Aos Dr. Aline Filgueiras, William Caneschi e Angelina Almeida pelos ensinamentos e pela atenção desprendida sempre nos momentos em que precisava.

Ao Dr. Humberto de Mello Brandão e todos integrantes do seu laboratório da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) – Gado de leite que sempre nos receberam muito bem.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa realizada.

A todos os amigos do NEEM pelas horas de alegria e trabalho.

Aos amigos Bruno, Linus, Débora, Flávia Campos, Gabriela, Patrícia Lopes, Patrícia Barsan, Franciely, Raissa, Paulo Victor, Thaeny, Alessandra, Alan, Filipe pela ajuda, compartilhamento de conhecimento, retirada de dúvidas.

Ao meu pai Venício Louzada Índio do Brasil pelo apoio, dedicação e carinho todos esses anos.

*“O Campo da derrota não está povoado de fracassos, mas de homens que tombaram antes de vencer.”*

Abraham Lincoln

## RESUMO

A investigação do efeito sinérgico presente na associação envolvendo quitosana (QT), nanopartículas de prata (AgNPs) e antibióticos (ATBs) foi realizada por análise *in vitro* de sua ação antibacteriana contra estirpes bacterianas Gram negativas (*Escherichia coli*) e Gram positivas (*Staphylococcus aureus*). As interações químicas dos adsorbatos na superfície das AgNPs foram estudadas através da técnica de espectroscopia por espalhamento Raman intensificada por superfície (surface-enhanced Raman scattering - SERS). As análises comparativas, envolvendo cada componente isolado do coloide e a mistura de AgNPs estabilizadas com QT e os ATBs: azitromicina (AZ), levofloxacina (LE) e tetraciclina (TE), foram realizadas por teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e teste de checkerboard. Os ensaios mostraram efeitos antibacterianos sinérgicos e aditivos. O impacto do pH das soluções no meio de cultura foi avaliado, bem como as melhores condições para solubilização da QT, sendo os testes biológicos realizados de forma que o efeito do pH não interferisse na atividade antimicrobiana. O sinergismo observado na combinação de QT e AgNP foi notável, melhorando significativamente também os resultados da associação de AgNP-QT e ATBs, o que levou a uma redução de 37% para 99% na CIM dos ATBs. Também foram obtidos os espectros SERS e Raman dos ATB LV, TC, AZ, cefepime (CE), cloranfenicol (CL), ampicilina (AM), sulfametoxazol (SF), benzilpenicilina procaína (BP), penicilina G (PG). Assim como avaliações complementares do espalhamento da luz dinâmica (DLS) e potencial zeta para avaliação do tamanho e estabilidade das suspensões de AgNPs e QT.

Palavras chave: Nanopartículas. SERS. Antibiótico. Raman. Quitosana. pH.

## ABSTRACT

Investigation of the synergistic effect present in the association involving chitosan (QT), silver nanoparticles (AgNPs) and antibiotics (ATBs) was performed by *in vitro* analysis of their antibacterial action against Gram negative (*Escherichia coli*) and Gram positive (*Staphylococcus aureus*) bacterial strains. The chemical interactions of the adsorbates on the surface of the AgNPs were studied by the technique of surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy. Comparative analyzes involving each component isolated from colloid and the mixture of QT-stabilized AgNPs and ATBs: azithromycin (AZ), levofloxacin (LE) and tetracycline (TE) were performed by minimum inhibitory concentration (MIC) and checkerboard test. The tests showed synergistic and additive antibacterial effect. The pH impact of the solutions in the culture medium was evaluated, as well as the best conditions for QT solubilization, and the biological tests were performed in such a way that the pH effect did not interfere with the antimicrobial activity. The synergism observed in the combination of QT and AgNP was remarkable, also significantly improving the results of the association of AgNP-QT and ATBs, which led to a reduction of 37% to 99% in the MIC of ATBs. The SERS and Raman spectra of the ATBs LV, TC, AZ, cefepime (CE), chloramphenicol (CL), ampicillin (AM), sulfamethoxazole (SF), benzylpenicillin procaine (BP) and penicillin G (PG) were also obtained. As well as complementary evaluations of the dynamic light scattering (DLS) and zeta potential to assess the size and stability of the suspensions of AgNPs and QT.

Keywords: Nanoparticles. SERS. Antibiotics. Raman. Chitosan. pH.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Obtenção da QT a partir da quitina.....	20
Figura 2: Parede Celular das Bactérias Gram-negativas .....	23
Figura 3: Parede Celular das Bactérias Gram-positivas .....	23
Figura 4: Mecanismos de resistência bacteriana .....	24
Figura 5: Esquema do mecanismo de espalhamento elástico (Rayleigh) e inelástico (Stokes e anti-Stokes). $v_0$ , $v_s$ são as frequências (que são proporcionais às energias) da radiação excitante, da radiação espalhada, respectivamente .....	29
Figura 6: Taça de <i>Lycurgus</i> .....	32
Figura 7: Oscilação do plásmon de superfície devido a luz incidente com comprimento de onda específico.....	33
Figura 8: Relação comprimento de onda ( $\lambda$ ) vs. diâmetro da NP.....	34
Figura 9: Representação esquemática da evolução da separação da banda de valência e da banda de condução com o aumento do número de átomos de uma NP metálica .....	37
Figura 10: Demonstração gráfica da influência da polarização da luz sobre o <i>hot spots</i>	38
Figura 11: Possíveis resultados para a ligação de partículas numa mistura binária como determinado a partir da análise de distribuição de potencial $\zeta$ . (a) Distribuição de dois componentes individuais sobrepostos; (b) distribuição de mistura binária sem atração entre os dois componentes; (c) distribuição de mistura binária com forte atração com componente B recobrando o componente A; (d) distribuição de mistura binária com forte atração entre os dois componentes, mas componentes insuficientes A para cobrir B ou vice-versa; (e) distribuição de mistura binária com fraca atração onde existem componentes e agregados individuais; (f) representação esquemática do potencial de interação total (teoria DLVO) entre os componentes A e B para os sistemas b, c / d e e, respectivamente .....	43
Figura 12: Potencial entre a superfície da partícula e o líquido dispersante que varia de acordo com a distância da superfície da partícula .....	44
Figura 13: Fórmula estrutural (a)AM (b) PG .....	46
Figura 14: Fórmula estrutural da LV .....	47
Figura 15: Fórmula estrutural da TC.....	48
Figura 16: Fórmula estrutural da AZ.....	48
Figura 17: Fórmula estrutural do CL.....	49
Figura 18: Fórmula estrutural do CE.....	50
Figura 19: Fórmula estrutural do SF.....	51

Figura 20: Teste CIM (a) e teste <i>checkerboard</i> (b) (círculos brancos “○” indicam meio de cultura livre de crescimento de microrganismos, círculos cinza “●” indicam crescimento de microrganismos e o quadrado “□” indica CIMi (a) ou CIMi-C para <i>checkerboard</i> .....	57
Figura 21: Espectros UV-VIS das soluções aquosas dos ácidos, do NaOH e da QBPM (caminho óptico: 5mm) .....	61
Figura 22: Espectros de extinção da solução de QBPM em diferentes ácidos (caminho óptico: 5mm) .....	62
Figura 23: Espectros de absorção da QBPM em função do pH (caminho óptico: 5mm)	63
Figura 24: Espectros UV-VIS normalizados (ordem 10x) das AgNPs preparadas de acordo com modificação na síntese descrita por Filgueras <i>et al</i> (2013) e Van Hyning e Zukoski (1998). Caminho óptico: 5mm; diluição:10x .....	64
Figura 25: Espectros UV-VIS do Col L preparadas com agitação magnética em banho de gelo. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x .....	65
Figura 26: Espectros UV-VIS do Col G preparados com agitação ultrassônica em temperatura ambiente. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x .....	65
Figura 27: Espectros UV-VIS do Col K preparadas com agitação magnética em temperatura ambiente. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x .....	66
Figura 28: Espectros UV-VIS do Col J preparadas com agitação manual em banho térmico a 25°C. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x.....	66
Figura 29: Espectros UV-VIS normalizados, das AgNPs preparadas com diferentes tipos de agitação e diferentes temperaturas. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x .....	67
Figura 30: Espectros UV-VIS normalizado do Col G X pH. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x .....	68
Figura 31: Espectros UV-VIS do Col G para avaliação da estabilidade. Caminho óptico: 5 mm; diluição:10x.....	69
Figura 32: A) Espectro SERS da AM $1.10^{-2}$ mol/L e B) Espectro Raman da AM sólida	79
Figura 33: Geometria de adsorção da AM.....	80
Figura 34: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.....	80
Figura 35: A) Espectro SERS da BP $3.70^{-3}$ mol/L e B) Espectro Raman da BP sólida...	81
Figura 36: Geometria de adsorção da BP .....	82
Figura 37: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.....	83
Figura 38: A) Espectro SERS da PG $3.00^{-3}$ mol/L e B) Espectro Raman da PG sólida ..	84

Figura 39: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.....	85
Figura 40: Fórmula estrutural da Procaína .....	85
Figura 41 Espectro Raman do sólido PG Vs BP (150 a 1750 $\text{cm}^{-1}$ ).....	86
Figura 42: Espectro Raman do sólido PG Vs BP (1750 a 3400 $\text{cm}^{-1}$ ).....	86
Figura 43: Espectro SERS da PG Vs BP .....	87
Figura 44: A) Espectro SERS da CE $1.10^{-2}$ mol/L e B) Espectro Raman da CE sólida ..	87
Figura 45: Geometria de adsorção da CE.....	89
Figura 46: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.....	89
Figura 47: A) Espectro SERS da AZ $1.10^{-2}$ mol/L e B) Espectro Raman da AZ sólida ..	90
Figura 48: Geometria de adsorção da AZ.....	91
Figura 49: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.....	89
Figura 50: A) Espectro SERS da CL $3.10^{-3}$ mol/L e B) Espectro Raman da CL sólida ..	92
Figura 51: Geometria de adsorção do CL.....	93
Figura 52: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.....	93
Figura 53: A) Espectro SERS da LV $1.10^{-2}$ mol/L. B) Espectro Raman sólido.....	94
Figura 54: Geometria de adsorção da LV.....	95
Figura 55: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.....	95
Figura 56: A) Espectro SERS da SF $1.10^{-3}$ mol/L e B) Espectro Raman da SF sólido....	96
Figura 57: Geometria de adsorção do SF .....	97
Figura 58: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.....	97
Figura 59: A) SERS da TC $1.10^{-3}$ mol/L. B) Espectro Raman TC sólido.....	98
Figura 60: Geometria de adsorção da TC .....	99
Figura 61: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.....	100

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Proporções de AgNO <sub>3</sub> , NaBH <sub>4</sub> e QBPM nas diferentes sínteses dos coloides	56
Tabela 2: Ajuste de pH da QBPM com NaOH 1 mol L <sup>-1</sup>	63
Tabela 3: Potencial ζ das amostras	70
Tabela 4: Intensidade do espalhamento DLS	72
Tabela 5: Impacto do pH sobre o meio de cultura	73
Tabela 6: Valores de CIM para o meio de cultura com pH ajustado para o valor 6,0 (pH ajustado com HCl 1,0M)	74
Tabela 7: Valores de CIM para o meio de cultura em pH 7,2 conforme preparo do fabricante	74
Tabela 8: Testes biológicos de CIM avaliado para os brancos e substâncias testadas (pH 6,0)	75
Tabela 9: Cálculo de CIF das amostras p <i>E. Coli</i>	77
Tabela 10: CIF Index das amostras	77
Tabela 11: Cálculo de CIF das amostras p <i>S. Aureus</i>	77
Tabela 12: CIF Index das amostras	77
Tabela 13: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da AM (valores em cm <sup>-1</sup> )	79
Tabela 14: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da BP (valores em cm <sup>-1</sup> )	82
Tabela 15: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman do PG (valores em cm <sup>-1</sup> )	84
Tabela 16: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da CE (valores em cm <sup>-1</sup> )	88
Tabela 17: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da AZ (valores em cm <sup>-1</sup> )	90
Tabela 18: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da CL (valores em cm <sup>-1</sup> )	92
Tabela 19: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da LV (valores em cm <sup>-1</sup> )	94
Tabela 20: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da SF (valores em cm <sup>-1</sup> )	97
Tabela 21: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da TC (valores em cm <sup>-1</sup> )	99

## LISTA DE ABREVIATURAS

AgNP – Nanopartículas de Prata

AM – Ampicilina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATB – Antibiótico

ATP – Trifosfato de Adenosina

AZ – Azitromicina

BP – Benzilpenicilina (Penicilina G associada com procaína)

CE – Cefepime

CL – Cloranfenicol

CIF – Concentração Inibitória Fracionada

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMC – Carboximetilcelulose

Col – Coloide

DFT – Teoria de densidade funcional

DLS – Espalhamento da Luz dinâmica

DLVO – (sigla representando os nomes dos pesquisadores Deryaguin, Landau, Verwey, Overbeek) Derjaguin; Landau, (1941)

FDA – *Food and Drugs Administration*

GD – Grau de Desacetilação

HAc – Ácido acético

HOMO – Orbital molecular de maior energia ocupado

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICH – *The International Conference on Harmonisation*

IR – Infravermelho

IRL – Índice de Refração Local

LSPR – Ressonância do plásmon de superfície localizado

LUMO – Orbital molecular de menor energia desocupado

LV – Levofloxacina

NaBH<sub>4</sub> – Borohidreto de sódio

NP – Nanopartícula

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

PEG – Polietilenoglicol

PG – Penicilina G

QT – Quitosana

QBPM – Quitosana de Baixo Peso Molecular

QMPM – Quitosana de Baixo Peso Molecular

RMN – ressonância magnética nuclear

SERRS – Espectroscopia Raman ressonante intensificada por superfície

SERS – Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície

SF – Sulfametoxazol

TC – tetraciclina

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV-VIS – Espectroscopia de ultravioleta visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\omega$  – frequência

$\delta$  – deformação angular

$\upsilon$  – estiramento

$\gamma$  – fora do plano

$\tau$  – torção

$\perp$  – perpendicular

$\zeta$  – potencial zeta

fe – fenil

k – Vetor de onda

sh – ombro

sk – esqueleto

as – antissimétrico;

s – simétrico

carb – carboxilato

Lact – lactâmico

$\beta$  – Beta

$v_s$  – radiação espalhada a

$v_0$  – Radiação incidente

$v_m$  – estados rotacionais

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1. APLICAÇÕES DE NPS DE PRATA EM SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	18
1.2. QUITOSANA .....	19
1.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA .....	21
1.4. ESPECTROS SERS DE BIOMOLÉCULAS .....	25
1.5. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL.....	26
1.6. ESPECTROSCOPIA RAMAN .....	28
1.7. EFEITO RAMAN RESSONANTE.....	31
1.8. PROPRIEDADES ÓPTICAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	32
1.9. ESPECTROSCOPIA SERS.....	35
<b>1.9.1 Modelo Eletromagnético de intensificação por superfície</b> .....	<b>35</b>
<b>1.9.2 Modelo Químico de intensificação por superfície</b> .....	<b>39</b>
1.10. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS).....	40
1.11. POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ ).....	42
1.12. ANTIBIÓTICOS.....	44
<b>1.12.1 Penicilinas</b> .....	<b>45</b>
<b>1.12.2 Quinolonas</b> .....	<b>46</b>
<b>1.12.3 Tetraciclina</b> .....	<b>47</b>
<b>1.12.4 Macrolídeo</b> .....	<b>48</b>
<b>1.12.5 Cloranfenicol</b> .....	<b>49</b>
<b>1.12.6 Cefalosporinas</b> .....	<b>49</b>
<b>1.12.7 Sulfonamidas</b> .....	<b>50</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	52
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>53</b>
3.1. REAGENTES .....	53
3.2. MÉTODOS INSTRUMENTAIS .....	53
<b>3.2.1 Espectroscopia Raman e SERS</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2.2 Espectroscopia UV-VIS-NIR</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2.3 Banho ultrassônico</b> .....	<b>54</b>
<b>3.2.4 Potencial Zeta e DLS</b> .....	<b>54</b>
3.3. ESTUDO DE ESTABILIDADE DE SUSPENSÕES.....	54

3.4.	SÍNTESES .....	54
<b>3.4.1.</b>	<b>Síntese da suspensão coloidal de AgNP sem QBPM .....</b>	<b>55</b>
<b>3.4.2.</b>	<b>Síntese das suspensões coloidais de AgNPs com QBPM .....</b>	<b>55</b>
3.5.	ESPECTROS SERS DOS ANTIBIÓTICOS .....	56
3.6.	ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	56
3.7.	PREPARO DOS ATBS PARA OS TESTES BIOLÓGICOS .....	60
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>61</b>
4.1.	PREPARO DA QBPM .....	61
<b>4.1.1</b>	<b>Seleção dos ácidos utilizados na solubilização da QBPM .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Definição do ácido .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Solubilização da QBPM.....</b>	<b>62</b>
4.2.	SÍNTESE DAS AgNPs COM CONCENTRAÇÃO DE $Ag^- > BH_4^-$ (COLOIDE COL A) .....	63
4.3.	SÍNTESE DAS AgNPs COM CONCENTRAÇÃO DE $Ag^- \leq BH_4^-$ (COLOIDE COL B - M) .....	64
<b>4.3.1</b>	<b>Síntese das AgNPs com diferentes mecanismos de preparo.....</b>	<b>65</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Ajuste de pH do Col G.....</b>	<b>67</b>
4.4.	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES .....	68
4.5.	MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA $\zeta$ .....	69
4.6.	ESPALHAMENTO DLS.....	71
4.7.	ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	73
<b>4.7.</b>	<b>Ajuste de PH do meio .....</b>	<b>73</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Avaliação do impacto do pH .....</b>	<b>74</b>
<b>4.7.3</b>	<b>Concentração Inibitória Mínima - CIM .....</b>	<b>74</b>
<b>4.7.4</b>	<b>Resultado do <i>Checkboard</i> .....</b>	<b>76</b>
4.7.4.1	<i>Checkboard p/ E. Coli.....</i>	77
4.7.4.2	<i>Checkboard p/ S. Aureus.....</i>	77
4.8.	ESPECTROSCOPIA SERS.....	78
<b>4.8.1</b>	<b>Ampicilina (AM) .....</b>	<b>78</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Benzilpenicilina (BP = PG + procaína) .....</b>	<b>81</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Penicilina G (PG) .....</b>	<b>83</b>
<b>4.8.4</b>	<b>Diferença Raman – Penicilina G Vs Benzilpenicilina Procaina .....</b>	<b>85</b>
<b>4.8.5</b>	<b>Cefepime (CE) .....</b>	<b>87</b>
<b>4.8.6</b>	<b>Azitromicina (AZ).....</b>	<b>88</b>
<b>4.8.7</b>	<b>Cloranfenicol (CL).....</b>	<b>91</b>
<b>4.8.8</b>	<b>Levofloxacina (LV) .....</b>	<b>93</b>
<b>4.8.9</b>	<b>Sulfametoxazol (SF) .....</b>	<b>96</b>
<b>4.8.10</b>	<b>Tetraciclina (TC).....</b>	<b>98</b>

<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>113</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. APLICAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

As Nanopartículas (NPs) de ouro (Au) ou prata (Ag) têm atraído ao longo dos últimos anos interesse significativo de diferentes áreas da pesquisa, refletindo as propriedades funcionais extraordinárias e cada vez mais numerosas de suas aplicações. Devido ao fato das NPs apresentarem diferentes tamanhos e formas possuindo então propriedades ópticas distintas, e características magnéticas, elétricas, e catalíticas incomuns. (ZHU et al., 2015).

Atualmente, há várias pesquisas utilizando Nanopartículas de Prata (AgNPs) para transporte de droga, terapia fotodinâmica, identificação de tecidos por marcadores espectroscópicos (SONG et al., 2015). Entre os métodos físico-químicos investigativos de adsorbatos que fazem uso de AgNPs estão as espectroscopias de Ultravioleta Visível (UV-VIS-NIR) e Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS) (LE RU et AL., 2007), descritas nos itens 1.8 e 1.9.

Na literatura há descrição de vários métodos para a preparação de NPs de diferentes composições (como metal, carbono, magnético, semicondutor e NPs poliméricas) produzidas em fases sólidas, em suspensão, em superfícies e gases. As NPs oferecem muitas aplicações em uma variedade de campos científicos, desde química, têxtil até biologia e biomedicina. (ZHU et al., 2015).

O interesse renovado na Ag pode ser atribuído à sua eficácia bactericida a uma baixa concentração, à toxicidade relativamente limitada da prata iônica e metálica para as células humanas e aos recentes avanços na produção de NPs e técnicas de impregnação e tecnologias de polímeros. (MAILLARD; HARTEMANN, 2012)

Na literatura há descrição sobre diversas formas de sintetizar AgNPs, descrevendo à redução do  $Ag^+$  a  $Ag^0$ , no qual o modo de preparação se baseia, na redução do sal metálico, chamado de precursor ( $AgNO_3$ ), na presença de um agente redutor, muitas vezes boridreto de sódio ( $NaBH_4$ ) ou citrato de sódio ( $Na_3Cit$ ). Como o tamanho e a forma das AgNPs influenciam diretamente na espectroscopia SERS assim como na atividade antimicrobiana das mesmas, a concentração do agente redutor, o pH da suspensão coloidal, o tipo de agente redutor e a concentração e tipo do agente estabilizador, se faz vital.

Os mecanismos de ação, tanto dos sais de Ag, quanto de sua forma metálica nanoestruturada foram apenas parcialmente elucidados, e aparentam ser múltiplos. Apesar

disso, alguns efeitos observados parecem ser os mesmos para a prata iônica  $\text{Ag}^+$  e a reduzida  $\text{Ag}^0$  das NPs. (BERTE, 2013)

Sendo proposto que a  $\text{Ag}^+$  enquanto dentro da célula, interage por diferentes mecanismos, tais como redução significativa das concentrações de  $\text{K}^+$  e ATP intracelular em poucos minutos após o tratamento para ambas as espécies de Ag. Houve também, nesta mesma escala de tempo, dissipação da chamada força motriz de prótons, a diferença de potencial químico e elétrico existente entre a parte interna e externa da membrana celular gerada pelo transporte ativo de  $\text{H}^+$ , necessária para a síntese de ATP. A sua atividade antimicrobiana resulta da sua combinação e alteração de proteínas microbianas, com eventuais danos estruturais por ruptura metabólica. (MAILLARD; HARTEMANN, 2012)

As AgNPs até 80 nm mostraram ser capazes de penetrar as membranas celulares interna e externa das bactérias. Verificou-se que AgNPs com diâmetro inferior a 10 nm causam fuga citoplasmática formando poros na parede celular bacteriana sem afetar proteínas extracelulares e ácido nucleico bacteriano (MAILLARD; HARTEMANN, 2012) levando à lise osmótica microbiana. (MORONES et al., 2005) As AgNPs têm seu potencial uso como agente antibacteriano, sendo eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

## 1.2. QUITOSANA

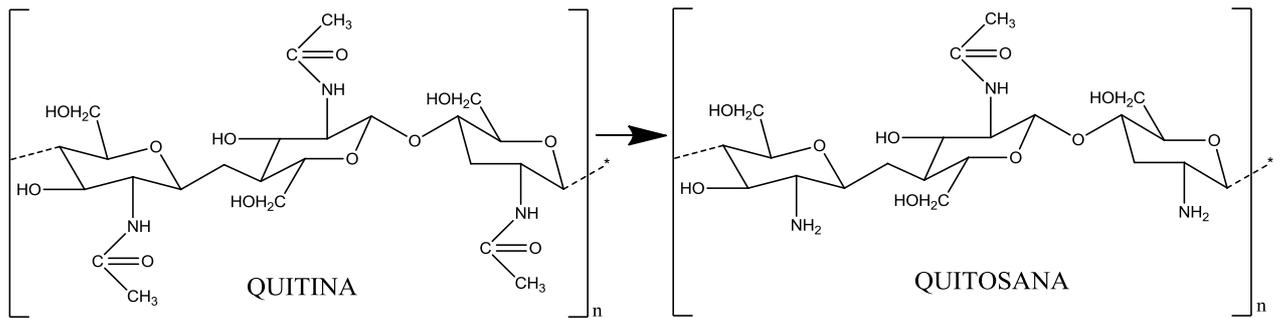
Quitosana (QT) é um polímero incorporada nas AgNPs com a finalidade de estabilização da suspensão coloidal (FILGUEIRAS, 2013) e intensificação do efeito antibacteriano por sinergia, uma vez que AgNPs e QT já apresentam isoladamente ação antibacteriana bem descrita na literatura.

A palavra polímero origina-se do grego poli (muitos) + meros (partes). Estes constituem um grupo particular de macromoléculas (moléculas constituídas por grandes cadeias de átomos) caracterizado pela repetição de um ou mais grupos atômicos (monômeros), que são responsáveis pela formação da cadeia polimérica e, conseqüentemente, suas características físico-químicas. Suas propriedades derivam principalmente das interações que ocorrem entre os elementos da sua macroestrutura (interações intramoleculares) ou com outros compostos (interações intermoleculares). Essas macromoléculas podem ser encontradas na natureza como proteínas e polissacarídeos, ou podem ser sintetizadas como o ácido polifosfórico. (SOUZA, 2015)

QT é obtido pela desacetilação química, superior a 40%, da quitina, que é um biopolímero abundante na natureza sendo encontrado principalmente em carapaças de

crustáceos (especialmente o caranguejo, camarão e lagosta), sendo também encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos, estrutura química da QT esta demonstrada na figura 1. (SINGLA, 2001)

Figura 1: Obtenção da QT a partir da quitina



Fonte: próprio autor

A história da QT teve início em 1859, quando o pesquisador Rouget relatou sua forma desacetilada. A partir de 1977, o interesse e pesquisas sobre a quitina e QT cresceu exponencialmente quando houve a 1ª Conferência Internacional de Quitina e QT em Boston. A QT foi produzida industrialmente pela primeira vez no Japão no ano de 1971 e onze anos mais tarde, este país já possuía quinze indústrias produzindo quitina e QT em larga escala comercial. (BEZERRA, 2011)

QT é constituído por unidades D-glicosaminas em proporções variáveis. (SILVA et al., 2006) O termo QT é usado para descrever uma série de cadeias poliméricas, com diferentes massas moleculares e graus de desacetilação (GD) (40%- 98%) (ILLUM, 1998). De acordo com o GD, parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades D-glicosamina, podem-se obter diversas QT variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade. (SILVA et al., 2006)

A aplicação farmacêutica da QT é limitada devido a problemas de hidrossolubilidade, uma vez que a referida é insolúvel em água, em meio neutro. Evidenciou-se que a massa molecular da QT influencia na solubilidade e na atividade antibacteriana dos derivados, atualmente no mercado há vários tipos de QT disponíveis. (BEZZERA, 2011)

A atividade antibacteriana depende largamente do peso molecular, do GD, da concentração em solução e do pH do meio. Estudos anteriores indicam que a QT é dissolvida numa solução ácida aquosa para permitir a protonação da amina, que passa de  $\text{NH}^2$  a  $\text{NH}^{3+}$ ,

resultando em atividade contra algumas estirpes de fungos, leveduras e bactérias. (ZIMOCH-KORZYCKA; JARMOLUK, 2014)

Com o intuito de reduzir essa divergência nas faixas de massa molecular obtidas, adotou-se a classificação das amostras de QT segundo a distribuição de massa molecular em: alta, média e baixa, assim como ocorre com outros polímeros, como o polietilenoglicol (PEG) e carboximetilcelulose (CMC). As QT de Baixo Peso Molecular (QBPM) estão na faixa de 100.000 g/mol, as QT de médio peso molecular (QMPM) na faixa de 500.000 g/mol, e as de alto peso na faixa acima de 1.000.000 g/mol. (BEZZERA, 2011) (SILVA, 2006)

Estudos mais recentes revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da QBPM está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo. Micrografias eletrônicas de *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva) e *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) na presença de QBPM mostraram que a membrana do *S. aureus* foi enfraquecida ou até mesmo fragmentada, enquanto o citoplasma da *E. coli* foi concentrado e o interstício da célula, ampliado, demonstrando que a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias Gram-negativas, quanto menor a massa molecular da QT, maior a atividade antimicrobiana. Esses resultados sugerem que os efeitos da QT são distintos nos dois tipos de bactérias. (SILVA, 2006)

### 1.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos (ATBs) e sua presença no meio ambiente. As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação e são promíscuas, podendo trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de diferentes espécies. São consideradas microrganismos de alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

Antes do século XXI a resistência bacteriana ocorria predominantemente em ambientes hospitalares. Atualmente, a resistência bacteriana está associada a diversos ambientes e pode atingir indivíduos saudáveis. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

Os produtos farmacêuticos, especialmente os ATBs, têm elevado essa preocupação global, devido à sua presença residual significativa (nível  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) no ambiente e danos potenciais ao sistema ecológico e à saúde humana. (LI; WEI; DU, 2015) Estima-se que 50 a 90% dos ATBs ingeridos são excretados em formas não metabolizadas, (SANTOS; MEIRELES; LANGE, 2015), devido à absorção e metabolização incompleta, fazendo com

que uma fração considerável dessas substâncias seja descarregada no ambiente aquático. (LI; WEI; DU, 2015) Além disso, os ATBs podem movimentar e se acumular no solo (até níveis de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), como consequência do uso comum de adubo e de lodo de esgoto como fertilizantes. (PICÓ; ANDREU, 2006; (STURINI et al., 2012; LI; WEI; DU, 2015)

Os ATBs liberados atingem as estações de tratamento de águas, contaminando o meio ambiente. (SANTOS; MEIRELES; LANGE, 2015) As descargas de águas residuais das estações de tratamento de águas são a principal fonte de ATBs no meio aquático. (KÜMMERER, 2009; FATTA-KASSINOS; MERIC; NIKOLAOU, 2010; WEI; DU, 2015) Uma entrada contínua de ATBs no meio ambiente fornece condições adequadas para o desenvolvimento seletivo em direção a organismos resistentes (GARTISER et al., 2007; DODD, 2012). Além da indução da resistência, podem surgir possíveis efeitos tóxicos cada vez mais preocupantes na fauna e na flora. (CARLSSON; ÖRN; LARSSON, 2009; EBERT et al., 2011; WEI; DU, 2015)

Todos os anos nos Estados Unidos, pelo menos 2 milhões de pessoas ficam infectadas com bactérias que são resistentes a ATBs e pelo menos 23.000 pessoas morrem a cada ano como resultado direto dessas infecções. (CDC - USA, 2016)

Projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram que, a partir do ano de 2050, cerca de 10 milhões de pessoas morrerão por ano, por causa de bactérias resistentes a ATBs. Número superior que o atual relativo a pacientes que vão a óbito por causa do câncer, número esse representado pelo montante de 8,2 milhões ao ano. (GOUSSINSKY, 2017)

O Brasil também tem algumas regiões com tal problema. Dados da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) mostram que, em 2015, a *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase* foi a bactéria multirresistente mais notificada nas UTIs brasileiras. (GOUSSINSKY, 2017)

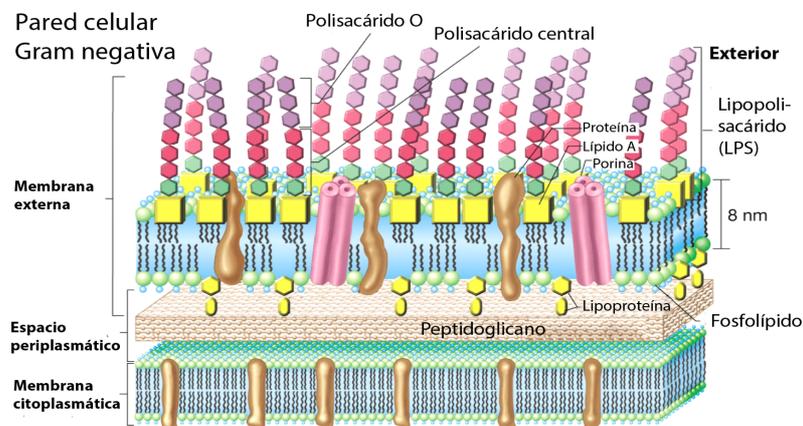
Os ATBs desempenham um papel importante no tratamento clínico e na indústria pecuária. Entretanto, o uso excessivo dos ATBs resultou na ocorrência e disseminação de bactérias resistentes e genes de resistência. (HUANG et al., 2015). A associação de ATB com AgNPs pode levar ao sinergismo e diminuição das doses usuais dos ATBs, com isso diminuindo os resíduos eliminados no ambiente.

De acordo com a técnica de Gram as bactérias podem ser classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas. As bactérias que são coradas pelo método são classificadas como Gram-positivas, já as não coradas pelo método são classificadas como Gram-negativas. A coloração ou não é dependente das diferenças estruturais, composição química,

permeabilidade celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade (PELCZAR, REID E CHAN, 1997).

O componente da parede celular que determina se a bactéria é Gram-positiva ou Gram-negativa é o peptidoglicano. Nas bactérias Gram-negativas, o peptidoglicano constitui uma fração menor do total da parede celular cerca de 10%, além de possuírem uma membrana externa de lipopolissacarídeo; proteínas porinas e lipoproteínas, possuindo também um espaço periplasmático entre a membrana externa e membrana citoplasmática, como demonstrado na figura 2.

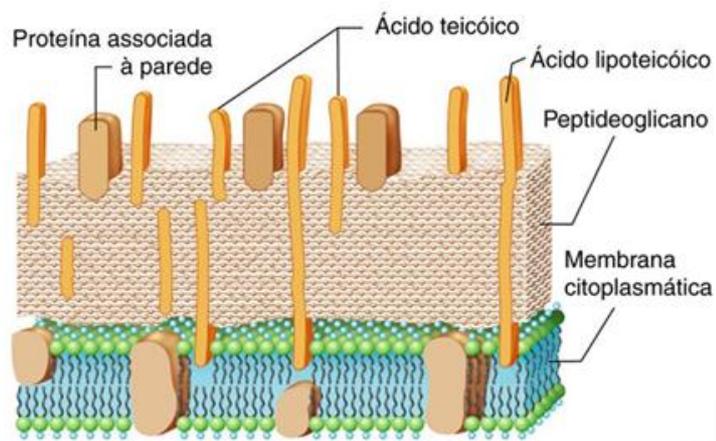
Figura 2: Parede Celular das Bactérias Gram-negativas



Fonte: PELCZAR, REID E CHAN, 2007

Já as bactérias Gram-positivas possuem cerca de 90% de sua parede constituída por peptidoglicanos e ácido teicoico (polissacarídeo ácido com resíduo de glicerol fosfato ou ribitol fosfato). (PELCZAR, REID E CHAN, 1997). Como exemplificado na figura 3.

Figura 3: Parede Celular das Bactérias Gram-positivas



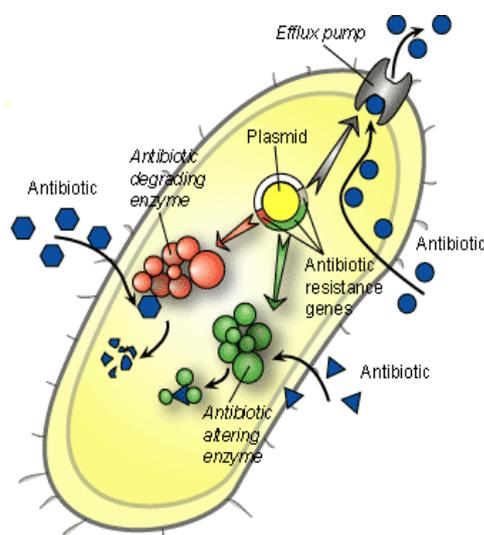
Fonte: PELCZAR, REID E CHAN, 2007

A partir de 1950, quando os ATBs passaram a ser amplamente utilizados, iniciou-se o fenômeno da resistência bacteriana. Desde então, o problema da resistência aos antibióticos passou a representar importância considerável em saúde pública. Figura 4 exemplifica os tipos de resistência bacteriana aos ATBs

Os principais mecanismos de resistências às drogas podem ser devidos a:

- Inibição competitiva entre um metabolito essencial e um antibiótico;
- Desenvolvimento de uma via metabólica alternativa, que evita alguma reação normalmente inibida pela droga;
- Produção de uma enzima alterada de tal modo que esta funciona em benefício da célula bacteriana, mas não é afetada pela droga;
- Síntese de excesso de enzima, ultrapassando a quantidade que pode ser inativada pelo antimicrobiano;
- Dificuldade de a droga penetrar na célula, devido a alguma alteração da membrana citoplasmática;
- Modificação estrutural das nucleoproteínas ribossômicas;

Figura 4: Mecanismos de resistência bacteriana



Fonte: The Science Creative Quarterly 2: Jan-march 2007

Dessa forma, a resistência bacteriana a diversos ATBs impõe certas limitações para o tratamento de diversas infecções, tornando-se imprescindível a descoberta de novos agentes antibacterianos.

Nestas interações há forte dependência com a forma e o tamanho das AgNPs. NPs com tamanhos entre 5-10nm possuem uma atividade antibacteriana maior quando comparadas

com as AgNPs com tamanhos entre 30-100nm. (GARCÍA-BARRASA, LÓPEZ-DE-LUZURIAGA E MONGE, 2011)

#### 1.4. ESPECTROS SERS DE BIOMOLÉCULAS

A espectroscopia Raman tornou-se uma ferramenta importante para o estudo bioquímico, por possuir vantagens como medição rápida, melhor identificação de analítos, não pré-tratados e não destruição de amostras e baixa secção de choque da água.

Contudo, o sinal Raman em solução é muito fraco quando comparado com outros métodos de análise frequentemente utilizados, tais como a fotoluminescência e a espectroscopia de infravermelho (IR), o que limita grandemente as suas aplicações práticas. Já a espectroscopia SERS amplificam os sinais Raman da amostra por meio da adsorção desses materiais na superfície do metal, o que pode ser suficiente para a detecção de moléculas isoladas. (WANG et al., 2015)

Andreou *et al.* mostraram que ampicilina (AM), um ATB comum, foi detectada em concentrações de rastreio no leite utilizando espectroscopia SERS num dispositivo microfluídico, utilizando menos de 20 µL de amostra, em 10 minutos, com uma preparação mínima fora do chip. Pode ser então uma rápida metodologia para determinar a presença desse contaminante no leite em pequenas concentrações relevantes, que pode ser útil para a indústria alimentar e agências reguladoras, como o FDA ou ANVISA investigarem o uso indiscriminado dessas drogas. (ANDREOU et al., 2015)

Xin *et al.* demonstrou que espectroscopia Raman e a espectroscopia SERS podem ser utilizadas para estudar a adsorção e a presença da Penicilina G (PG). Os resultados mostram que PG está próximo da superfície do substrato de prata através do grupo carboxilo, e o limite de detecção de PG é reduzido para  $1 \times 10^{-7}$  mol / L. Em conformidade, a análise quantitativa de PG pode ser realizada na gama de  $1 \times 10^{-4}$  até  $1 \times 10^{-7}$  mol / L de concentração. (JIANG et al., 2015)

Howes *et al.* estudaram os espectros SERRS (dos antibióticos rifampicina, rifamicina e rifaximin utilizando coloide de prata e variando o pH da suspensão para os três antibióticos. (HOWES *et al.*, 2006)

O espectro SERRS da rifampicina foi obtido somente para  $\text{pH} < 7,7$ , enquanto a rifamicina mostrou melhor desempenho SERRS para o  $\text{pH} < 7,0$ , propondo assim, a alta dependência da espécie adsorvida com o pH do meio. Os autores propuseram ainda, que a mudança no grupo cromóforo dos ATBs estudados influenciou fortemente nos espectros SERRS da rifampicina, rifamicina e rifamicin. (HOWES *et al.*, 2006)

Iliescu *et al.* mostraram o estudo da adsorção da PG sobre colóide de prata. (ILIESCU, BAIÁ E PAVEL, 2006) Os autores calcularam as frequências vibracionais da molécula livre baseado em cálculos DFT (teoria de densidade funcional), e a partir das atribuições dos espectros SERS chegaram à conclusão que a PG adsorvia fortemente pelo grupo carboxilato.

Os anéis benzênicos,  $\beta$ -lactâmico e o grupo tiazolidinil estão longe do sítio de adsorção, perdendo intensidade nos espectros SERS, uma vez que os modos normais de vibração associados estão paralelos à superfície da prata. Isto é uma consequência das regras de seleção de superfície, que interfere diretamente na intensidade relativa das bandas, isto é, no padrão espectral dos espectros SERS. (MOSKOVITS, 1982)

Wei Ji *et al.* estudaram o cloranfenicol (CL) um ATB que teve seu uso proibido em animais produtores de alimentos. No estudo, o SERS de NPs de Au foi utilizado para a análise rápida de CL. A análise quantitativa de resíduos de CL em alimentos revelou que a técnica SERS com NPs de Au era sensível e de boa estabilidade e correlação linear e adequada para análise rápida de resíduos de CL em uma variedade de amostras de alimentos.

He *et al.* obtiveram o espectro SERS dos antibióticos enrofloxacino, ciprofloxacino e CL utilizando dendríticos de prata para a detecção rápida e caracterização destes ATBs. (HE *et al.*, 2010) Os autores mostraram que os dendríticos de prata apresentaram um fator de intensificação SERS de  $\sim 10^{14}$  vezes, mostrando um limite de detecção e quantificação para estes ATBs da ordem de 20 ppb.

## 1.5. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

A interação da luz com a matéria engloba uma grande variedade de fenômenos. A luz, ao atingir um dado material, pode ser espalhada, absorvida ou emitida. Diversos mecanismos de interação podem estar envolvidos, como o espalhamento por excitons, polaritons, fônons. Cada processo depende das características dos materiais e também da energia da radiação incidente. (ADO *et al.*, 2011)

A espectroscopia molecular estuda a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Os espectros fornecem as transições (diferença de energia entre os níveis), sendo que a partir dessas medidas podem-se determinar as posições relativas dos níveis energéticos. (SALA, 2008) No caso de moléculas, a região espectral onde as transições são realizadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônico, rotacional ou vibracional. (SOUZA, 2015)

A energia total da molécula pode então ser dividida em eletrônica, vibracional, rotacional e translacional (térmica). (ATKINS, 2006) A origem das espectroscopias está na quantização destas energias. (AROCA, 2006) Para o estudo da espectroscopia vibracional, não completamente independente, mas na maioria dos casos satisfatória, a separação dos movimentos eletrônicos e vibratórios é justificada desde que somente o estado eletrônico fundamental esteja ocupado. A separação dos modos vibracional e rotacional se justificada na medida em que a constante de rotação é independente da vibracional. Podendo então considerar separadamente cada energia, estudando independentemente cada espectro e as interações entre eles. (ATKINS, 2006)

As principais técnicas vibracionais utilizadas são a espectroscopia de absorção no IR, a espectroscopia de espalhamento Raman e numa extensão muito menor, a espectroscopia de espalhamento de nêutrons. (ANDO, 2005)

Através destas é possível obter informações sobre as ligações químicas através das constantes de força e os valores das frequências de vibração, além disto, podem-se obter informações sobre a geometria da molécula investigando o número de modos vibracionais presentes no infravermelho e Raman. (SOUZA, 2015)

A espectroscopia de absorção no IR envolve essencialmente a interação ressonante entre fótons na região do IR e os auto-estados vibracionais da molécula, sendo que a energia do fóton absorvido deve ter o mesmo valor da diferença da energia entre dois estados vibracionais, envolvendo ressonância entre a diferença de energia da molécula e da radiação eletromagnética. Resumindo, sendo igual à diferença de energia entre dois particulares auto-estados:  $h\nu = E_2 - E_1$ . (ANDO, 2005) Equação que será melhor descrita no próximo tópico sobre espectroscopia Raman.

Na espectroscopia Raman a radiação interage com a molécula e espalha o fóton da radiação eletromagnética incidida, com frequência modificada em relação à incidida, correspondendo à diferença de energia entre dois estados vibracionais.

Em resumo a espectroscopia Raman envolve o espalhamento de fótons de forma inelástica, enquanto a espectroscopia IR envolve a absorção de fótons em ressonância com as transições vibracionais.

A quantidade de bandas, suas frequências e intensidades relativas associadas a cada modo normal de vibração levam a diferentes padrões espectrais nos espectros Raman e nos espectros IR. A atribuição dos mesmos fornece informações sobre a estrutura, à conformação e o ambiente químico da espécie molecular presente. (FILGUEIRAS, 2013)

### 1.6. ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman teve origem em 1928 quando Sir Chandrasekhara Venkata Raman publicou um artigo onde descrevia a observação experimental do espalhamento inelástico da luz visível (RAMAN, KRISHNAN, 1928; MILLEN, DE FARIA, TEMPERINI, 2005), feito este que lhe rendeu o prêmio Nobel de Física em 1930 (MILLEN, DE FARIA, TEMPERINI, 2005).

Em um espectrômetro Raman, a amostra é irradiada com uma fonte intensa de radiação monocromática, na região do infravermelho próximo ou visível ou ultravioleta. Normalmente a frequência desta radiação é muito maior do que a frequência vibracional, porém bem menor do que a frequência requerida para ocorrer à transição eletrônica. A radiação espalhada pela amostra é então analisada pelo equipamento. (SOUZA, 2015)

A espectroscopia Raman é uma técnica rápida quando comparada com outros métodos tais como a cromatografia, ressonância magnética nuclear (RMN), sendo um método simples, sensível e eficaz sem pré-processamento de amostra para análise de fármaco, tendo sua aplicação já descrita para a análise de cefalotina, Aspirina, Viagra e paracetamol falsificados. A espectroscopia Raman permite investigar a farmacocinética com a maior resolução possível, mesmo em células vivas. (JIN et al., 2015)

Assim como no espectro de absorção no IR, o espectro Raman também fornece um conjunto de bandas atribuídas às transições vibracionais da molécula, (CASANOVA, 2010). No entanto, não é necessário haver uma absorção do fóton em ressonância com os diferentes níveis de energia vibracional da molécula. Para que ocorra a transição vibracional no efeito Raman é necessário que a energia do fóton incidente seja diferente da energia do fóton espalhado e a diferença de energia entre eles é igual a de dois estados vibracionais da molécula, como mostrado na equação 1.

$$h\nu_0 = h\nu_s - \nu_j. \text{ Equação 1}$$

A equação 1 envolve uma aproximação estabelecida pelo modelo do oscilador harmônico, situação na qual o tratamento quântico impõe que as transições permitidas em princípio, envolvem níveis de energia vibracionais separados por  $\Delta v = \pm 1$ . (OLIVEIRA, 2009)

O fato dos espectros Raman e IR, em geral, não serem idênticos, reflete a existência de diferentes regras de seleção, pois na espectroscopia Raman, a variação da polarizabilidade

com o modo normal deve ser diferente de zero (equação 2), enquanto no IR a variação do dipolo elétrico intrínseco com o modo normal é que deve existir:

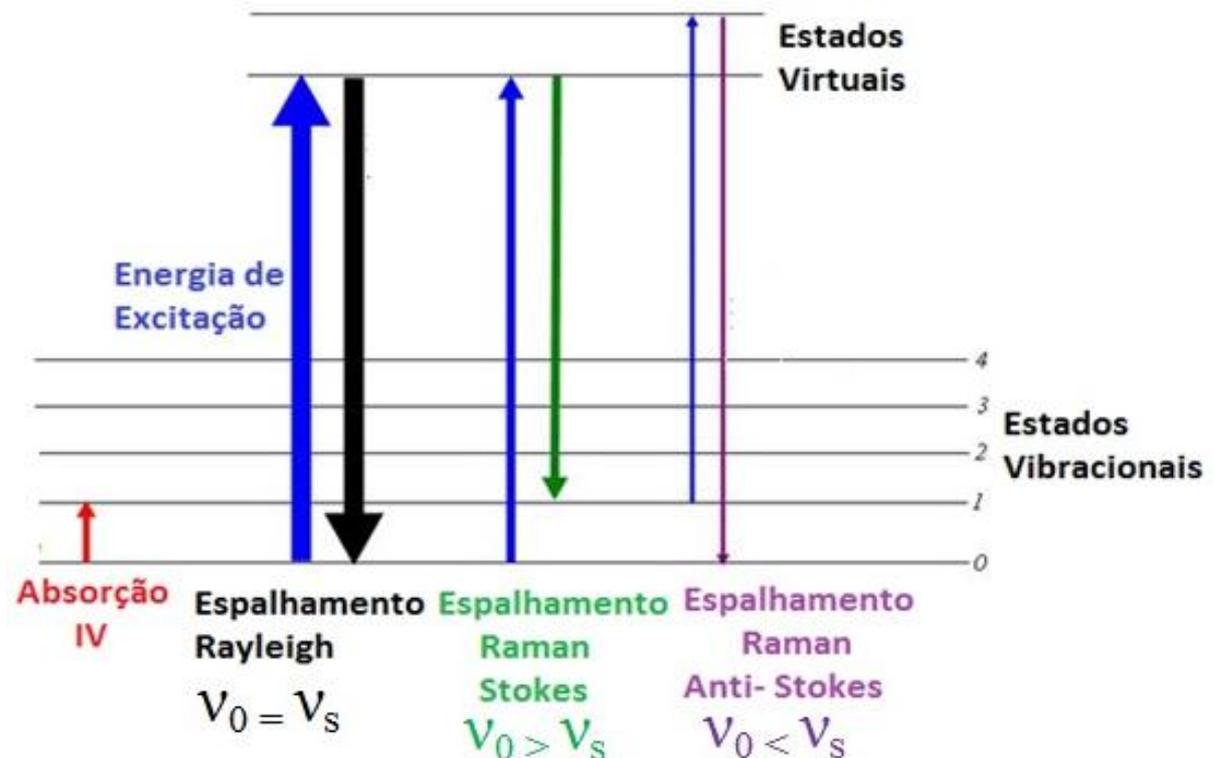
$$\left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_0 \neq 0$$

**Equação 2**

onde  $\alpha$  representa a polarizabilidade eletrônica molecular. (ANDO, 2005)

Uma diferença essencial entre a espectroscopia Raman perante as espectroscopias IR, eletrônica é devido ao fato de na espectroscopia Raman haver o fenômeno de espalhamento dos fótons incididos. (ATKINS, 2006) Existindo dois tipos principais de espalhamento: espalhamento elástico (espalhamento Rayleigh), onde o fóton incidido é espalhado com a mesma energia; e espalhamento inelástico (espalhamento anti-Stokes e Stokes), onde o fóton é espalhado com energia diferente da energia incidida, sendo esses últimos os mais importantes para a espectroscopia. A Figura 5 demonstra a representação deste processo.

Figura 5: Esquema do mecanismo de espalhamento elástico (Rayleigh) e inelástico (Stokes e anti-Stokes).  $\nu_0$ ,  $\nu_s$  são as frequências (que são proporcionais às energias) da radiação excitante, da radiação espalhada, respectivamente.



Fonte: próprio autor

Como demonstrando intencionalmente pela largura das setas na figura 5, a maior parte da luz espalhada tem a mesma frequência  $\nu_0$  da radiação incidente (espalhamento Rayleigh), enquanto apenas cerca de  $1/10^7$  é espalhada inelasticamente (espalhamento Raman). (VILLAR, 2006) O espalhamento inelástico, mesmo que sutil, fornece informações preciosas sobre a estrutura da molécula.

A diferença entre a frequência da radiação espalhada  $\nu_s$  a incidente  $\nu_0$  corresponde à frequência natural dos estados vibracionais ou rotacionais da molécula. Logo, a frequência da radiação incidente  $\nu_0$  será acrescida ou diminuída de um montante  $\nu_m$ , que chamamos de deslocamento Raman.

Se a molécula ganhar energia, a radiação espalhada terá frequência menor que a radiação incidida ( $\nu_0 - \nu_m$ ) e ocorrerá o espalhamento Stokes. Já transferência de energia da molécula, onde,  $\nu_s$  é maior que  $\nu_0$ , ocorrerá o espalhamento anti-Stokes no espectro ( $\nu_0 + \nu_m$ ). Essas linhas são bandas discretas devido às transições vibracionais na matriz da amostra, sendo assim menos intensas. (OLIVEIRA 2009, FERRARO et al 2003, DEREK 2002, WARTEWIG 2003)

Comumente, apesar de pouco intenso, o espalhamento Stokes é o mais utilizado pela maior intensidade de seu sinal em relação ao espalhamento anti-Stokes, pois enquanto o primeiro depende da população do estado vibracional fundamental, o último depende da população de estados vibracionais excitados. (SALA, 2008)

O efeito Raman, como mencionado anteriormente, está relacionado com os estados vibracionais inicial, final e também com um conjunto de estados virtuais cujas energias não têm qualquer valor limite. Isto inicialmente poderia representar uma dificuldade para a avaliação da intensidade do espalhamento Raman, pois precisaríamos inicialmente expressar a contribuição de infinitos estados virtuais para a polarizabilidade eletrônica durante os cálculos.

Sob o ponto de vista clássico a intensidade do espalhamento Raman é proporcional à frequência da luz espalhada (ARÊAS; KAWANO, 1990), podendo ser escrita de acordo com a seguinte equação:

$$I_R = N I_0 \sigma_R dz$$

### Equação 3

Onde  $N$  é o número de moléculas envolvidas no espalhamento Raman,  $I_0$  é a intensidade da radiação incidente,  $\sigma_R$  é a seção de choque Raman e  $dz$  é o caminho óptico do laser na amostra. (MCCREERY, 2000) De acordo com equação 3 o  $I_R$  é proporcional à  $\sigma_R$ . A

magnitude de  $\sigma_R$  é relacionada com  $\delta\alpha/\delta Q$  (equação 2), isto é, a variação da polarizabilidade com o deslocamento da coordenada  $Q$  em torno da posição de equilíbrio. Uma consequência dessa teoria é a variação da intensidade Raman,  $I_R$ , com a frequência da luz excitante e espalhada:

$$I_R = \mu(\nu_0 \pm \nu_j)^4 \alpha_j^2 Q_j^2 \quad \text{Equação 4}$$

Onde  $\mu$  é uma constante,  $\nu_0$  é a frequência da radiação excitante,  $\nu_j$  é a frequência fundamental do modo normal  $j$ , e  $\alpha_j$  é o momento de transição de um dipolo induzido. A equação 4 mostra que a intensidade Raman aumenta com a quarta potência da frequência Raman espalhada sendo definida como ( $I_R \propto \nu_s^4$ ). (RIBEIRO; SANTOS, 1992) O fator  $\nu^4$  é derivado do tratamento clássico do espalhamento de um dipolo induzido oscilante. Assim sendo, a seção de choque Raman  $\sigma_R$  está diretamente relacionada com  $\nu^4$  na equação 4, onde podemos inferir que  $I_R$  assume valores discretos de energia. (MCCREERY, 2000)

Devido à baixa seção de choque Raman ( $10^{-30} \text{ cm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1} \text{sr}^{-1}$ ) são necessárias aproximadamente  $10^8$  moléculas no volume investigado (LE RU *et al.*, 2007) para obter sinal do espalhamento Raman. Isso torna o efeito Raman pouco eficiente, tendo duas formas de se aumentar a intensidade do sinal, uma é o efeito Raman ressonante e a outra forma é através do efeito SERS (*surface enhanced Raman spectroscopy* - espalhamento Raman intensificado por superfície).

### 1.7. EFEITO RAMAN RESSONANTE

No efeito Raman ressonante se a energia da radiação excitante coincidir ou se aproximar da energia de uma transição eletrônica permitida da molécula há a intensificação do sinal espalhado. Esta intensificação, porém, é seletiva e não tem a mesma magnitude para todas as bandas, podendo este ganho de intensidade chegar a cinco ordens de grandeza (MILLEN; FARIA; TEMPERINI, 2005). Este tipo de intensificação é chamado de efeito Raman Ressonante.

A intensidade das bandas Raman, no efeito Raman ressonante, foi descrita por *Albrecht* como a soma de quatro termos, denominados A, B, C e D. Destes, o mais importante na grande maioria dos casos é o termo A, o qual é responsável pela intensificação dos modos totalmente simétricos, enquanto o termo B responde pelo aumento na intensidade dos modos não totalmente simétricos que intermediam o acoplamento entre o primeiro e o segundo estado eletrônico excitado (acoplamento vibrônico). O termo C está relacionado com o

acoplamento vibrônico entre o segundo estado eletrônico excitado e o estado eletrônico fundamental e o termo D descreve a intensificação das bandas de combinação e harmônicas. Esses três últimos termos (B, C e D), entretanto, só têm importância significativa quando a contribuição do termo A for pequena. (MILLEN; FARIA; TEMPERINI, 2005)

Além da informação vibracional, o efeito Raman ressonante nos permite obter informações sobre o estado eletrônico excitado pela medida da intensidade Raman em função da frequência da radiação excitante ou pela medida do fator de despolarização em função da frequência da radiação excitante. (SOUZA, 2015)

Neste contexto, outro efeito de intensificação como a espectroscopia SERS se apresenta como ferramenta poderosa para estudo e caracterização de monocamadas adsorvidas na superfície de metais como Ag, Au e Cu, uma vez que a intensificação do sinal Raman é da ordem de  $10^6$  vezes. (FARIA, TEMPERINI E SALA, 1999).

#### 1.8. PROPRIEDADES ÓPTICAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Metais como Au, Ag, cobre (Cu) ou alumínio (Al), têm sido conhecidos por terem propriedades ópticas diferentes dos materiais condutores padrão. Como por exemplo, a capacidade de refletirem a luz muito bem no visível, tornando-os bons materiais para espelhos de vários tipos. Estas propriedades ópticas particulares, juntamente com muitas outras propriedades físicas (tais como calor ou condutividade elétrica) têm a mesma origem física: a presença de elétrons de condução livre. (RU; ETCHEGOIN, 2009)

Talvez o exemplo mais antigo conhecido de utilização de nanomateriais se refere à Taça de Lycurgus (4 a.c.) mostrada na Figura 6. Essa taça ainda pode ser vista no *British Museum* e possui a propriedade de mudar de cor dependendo da luz incidente. Análise deste vidro revela que ele contém uma pequena quantidade de nanocristais metálicos (~ 70nm) contendo Ag e Au na proporção 14: 1. (CASANOVA, 2010)

Figura 6: Taça de Lycurgus

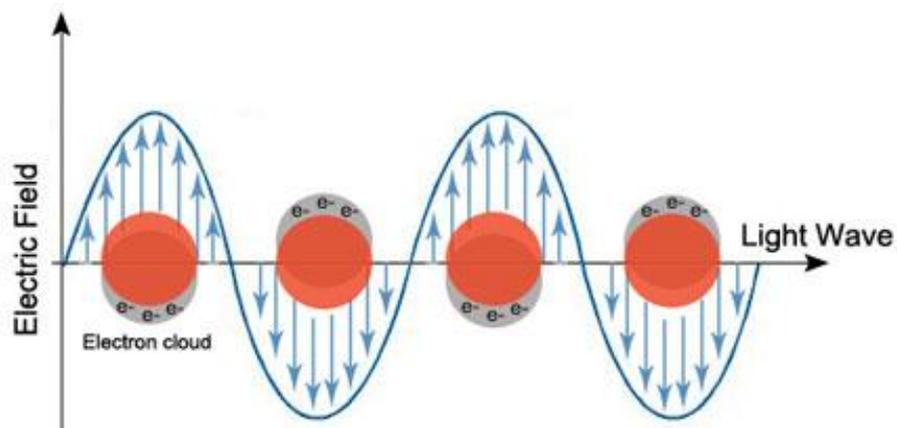


Fonte: CASANOVA, 2010.

Esses efeitos de cor são consequência do confinamento quântico dessas NPs e estão relacionados a mudanças na ressonância plasmônica de superfície – a frequência em que elétrons de condução oscilam em resposta ao campo elétrico alternante da radiação eletromagnética incidente. (CASANOVA, 2010)

Este fenômeno, chamado ressonância de plásmom de superfície localizada (LSPR), ocorre quando as dimensões do condutor são nanométricas, e NPs metálicas compostas por esses metais de cunhagem Au, Ag e Cu, com elétrons livres na banda de condução, sofrem efeitos ressonantes entre os elétrons condutores e a radiação eletromagnética incidente, com formação de dipolos induzidos como demonstrada na figura 7. (BARNES, 2003)

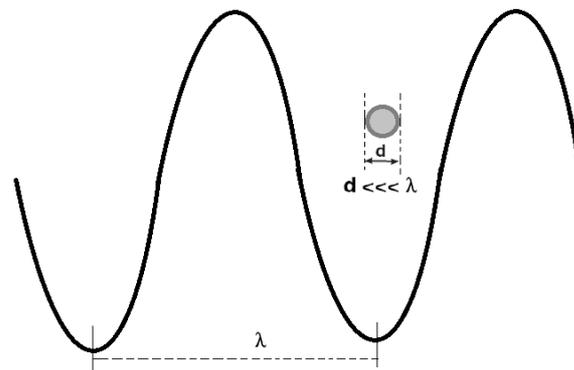
Figura 7: Oscilação do plásmom de superfície devido à luz incidente com comprimento de onda específico.



Fonte: CYTODIAGNOSTISC, 2017

A oscilação do plásmom de superfície considera um mar de elétrons se movimentando sob a influência de cátions fixos, sendo que a vibração de íons, ou fônons são ignoradas em uma primeira aproximação. Isso cria por definição um plasma que pode ser chamado de plasma de elétrons livres ou por plasma de estado sólido. (RU; ETCHEGOIN, 2009; ZAMARION, 2012) Possuindo uma frequência muito sensível ao formato e tamanho das NPs, de maneira que todos os elétrons confinados ficam submetidos ao mesmo campo em um dado intervalo de tempo. (AROCA, 2006) Devido a um comprimento de onda específico, a oscilação coletiva de elétrons na superfície das NPs resulta em forte extinção de luz (absorção e espalhamento).

Figura 8: Relação comprimento de onda ( $\lambda$ ) vs. diâmetro da NP



Fonte: próprio autor

A figura 7 exemplifica apenas o efeito da oscilação do plásmon de superfície, estando à mesma fora de escala. Como demonstrado na figura 8, o comprimento de onda ( $\lambda$ ) é bem maior que o diâmetro das NPs.

O fenômeno LSPR leva à absorção de fótons, que se manifestam como bandas de absorção na região do visível ou do infravermelho próximo do espectro eletromagnético, influenciados pelo ambiente dielétrico da superfície dessas NPs (LE RU *et al.*, 2007). Como resultado, as alterações nos máximos de comprimento de onda das bandas de absorção de Ressonância do plásmon de superfície localizado (LSPR) podem servir como sinais sensíveis para a detecção de moléculas adsorvidas na superfície das NP. (PARK *et al.*, 2016)

Especificamente, devido às alterações no índice de refração local (IRL), a banda de absorção LSPR desloca-se aproximadamente dezenas de nanômetros para comprimentos de onda mais longos quando moléculas são adsorvidas na superfície de partículas metálicas. (PARK *et al.*, 2016)

Muitas propriedades ópticas dos metais podem ser compreendidas utilizando a função dielétrica local da superfície dessas NPs, como descrita acima. Porém implicitamente pressupõe que a função dielétrica do metal é apenas dependente da frequência ( $\omega$ ), contudo, em alguns casos esta aproximação não tem êxito para fornecer uma explicação válida dessas observações experimentais. Sendo necessária uma descrição não local, em que a função dielétrica do material depende tanto da  $\omega$  como do vetor de onda ( $k$ ). (RU; ETCHEGOIN, 2009)

Um desses exemplos em que os efeitos não locais são importantes são as emissões relacionadas à superfície metálica, precisamente no caso SERS. O efeito da função dielétrica

e da espectroscopia LSPR será aprofundado na seção 1.9 dessa dissertação, onde será discutido o mecanismo eletromagnético para o efeito SERS.

## 1.9. ESPECTROSCOPIA SERS

A espectroscopia SERS adquiriu grande importância nos últimos anos em uma ampla gama de campos de pesquisa, tais como: a ciência da superfície, eletroquímica, biologia, ciência de materiais, arte, perícia e química analítica. O espectro SERS fornece informações estruturais da amostra (HERING *et al.*, 2007) e combina a especificidade da impressão digital molecular com a sensibilidade de uma única molécula. Por esta razão, pode ser considerada como uma ferramenta atraente para a detecção de moléculas em nível de traços. (CIALLA *et al.*, 2011; BENÍTEZ–MARTÍNEZ; LÓPEZ-LORENTE; VALCÁRCEL, 2015)

O efeito SERS foi descoberto por Fleischmann *et al.*, quando obtiveram o espectro Raman da piridina adsorvida em eletrodo de prata com uma alta relação sinal-ruído. A intensificação do sinal Raman foi, inicialmente, associada ao aumento da área superficial do eletrodo, sendo devida ao tratamento eletroquímico aplicado, com vários ciclos de oxidação e redução em solução aquosa de KCl  $0,1\text{mol.L}^{-1}$ . (FILGUEIRAS, 2013)

Em 1977, Jeanmaire *et al.* e Albrecht *et al.*, em dois trabalhos independentes, mostraram que o aumento da seção de choque da piridina adsorvida, era da ordem de  $10^6$  vezes. Portanto, a alta relação sinal/ruído dos espectros Raman da piridina não poderia ser explicado apenas pelo aumento da área superficial existente no eletrodo que deveria ser da ordem de  $10^2$  vezes. Estava caracterizado, assim um novo fenômeno, que recebeu o nome de efeito SERS. (FILGUEIRAS, 2013)

A descoberta do efeito SERS gerou um grande interesse e esforço da comunidade científica no sentido de entender o fenômeno. Após 40 anos de estudos minuciosos, o SERS está pronto para revolucionar a química analítica. (RU; ETCHEGOIN, 2009) Na década de 80, surgiram vários trabalhos teóricos para explicar tal efeito, que foi inicialmente observado em eletrodos ativados, suspensões coloidais e filmes finos. Estas teorias podem ser agrupadas em dois modelos: o modelo eletromagnético e o modelo químico ou molecular. (FILGUEIRAS, 2013)

### 1.9.1 Modelo eletromagnético de intensificação por superfície

O modelo eletromagnético envolve a excitação ressonante do plásmom de superfície pela radiação incidente. Esta excitação promove a intensificação do campo eletromagnético

local na superfície da NP metálica, intensificando dessa forma os sinais Raman das moléculas adsorvidas sobre a superfície do metal. (MOSKOVITS, 1985)

Um dos primeiros modelos gerados para explicação do efeito eletromagnético foi o dipolo-imagem (*image field*) (ZAMARION, 2012), pelo qual o dipolo elétrico intrínseco da molécula adsorvida levaria ao surgimento de um dipolo induzido na superfície metálica. A soma vetorial de ambos geraria uma intensificação do dipolo quando estivessem alinhados à normal da superfície e a resultante seria zero quando estivessem paralelos à superfície. Essa regra de seleção justificaria a observação preferencial dos modos normais cuja resultante estivesse na direção normal à superfície. Este modelo é válido admitindo-se uma adsorção física da espécie molecular, e muito próxima à superfície (até 2Å), mas não explica intensificações observadas quando esta distância aumenta. (SANT'ANA, 2006)

Um ponto interessante dessa técnica é a busca constante pelo substrato universal, cujos estudos tiveram início devido ao aumento da rugosidade dos eletrodos, (WU, D-Y.; DUAN, S.; REN, B.; TIAN, Z-Q, 2005) mas hoje, através de técnicas litográficas modernas e com metodologias de síntese química de NP das mais variadas formas e tamanhos, tem ido muito além na investigação da origem das intensificações observadas. (ZAMARION, 2012) A intensificação do sinal Raman depende do substrato metálico utilizado, sendo o efeito SERS comumente observado em metais de cunhagem, metais como Au, Ag e Cu. (SANT'ANA, 2006)

Uma das mais importantes considerações a respeito do mecanismo eletromagnético está no fato do adsorbato não precisar necessariamente estar em contato com a superfície. Isso significa que o campo elétrico intensificado na superfície possui uma amplitude de alguns nanômetros, de acordo com *Van Duyne* e colaboradores. (CAMDEN, J.P.; DIERINGER, J. A.; ZHAO, J.; VAN DUYNE, 2008)

Em analogia à equação 3, a intensidade SERS para um determinado modo vibracional é dada pela equação abaixo:

$$I_{SERS} = N(I_{\nu_L})|E(\nu_L)|^2 \cdot |E(\nu_s)|^2 \cdot \sigma_{ads}^R \quad \text{Equação 5}$$

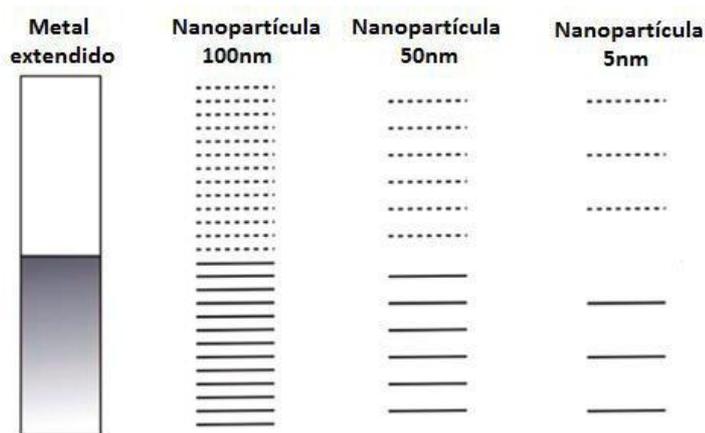
Em que  $\sigma_{ads}^R$  é a combinação dos componentes do tensor Raman da molécula adsorvida na superfície,  $I_{\nu_L}$  é a intensidade da radiação incidente,  $|E(\nu_L)|$  é o campo elétrico da radiação incidente,  $|E(\nu_s)|$  é o campo elétrico da radiação espalhada e N é o número de moléculas envolvidas no espalhamento SERS (KNEIPP *et al.*, 1999).

A observação do efeito SERS, de acordo com este modelo, esta diretamente ligada a superfícies rugosas, em nível nanométrico, para que ocorra a ressonância entre a transição LSPR e as radiações excitante e espalhada. (SANT'ANA, 2006)

O modelo eletromagnético possui forte dependência em relação ao formato e ao tamanho das NPs para intensificação do sinal Raman, pois estas propriedades modificam a posição da banda LSPR. Assim, a espectroscopia SERS está intrinsecamente ligada à nanociência, uma vez que o tamanho das estruturas metálicas com alto desempenho SERS é nanométrico. (FILGUEIRAS, 2013)

O tamanho das NPs pode intensificar o sinal Raman, pois de acordo Morton *et al.*, a evolução da separação da banda de valência e da banda de condução dos níveis de energia esta intimamente relacionado ao aumento do número de átomos presentes na superfície de uma NP. O aumento do número de átomos promove uma combinação adicional dos orbitais atômicos do metal, levando à formação de bandas de energia. Quanto maior o número de átomos na NP, menos espaçadas estará a banda de valência da banda de condução. No metal estendido, essas bandas de energia formam uma estrutura contínua, sem separação entre elas. (MORTON, SILVERSTEIN E JENSEN, 2011)

Figura 9: Representação esquemática da evolução da separação da banda de valência e da banda de condução com o aumento do número de átomos de uma NP metálica.



Fonte: Morton, Silverstein e Jensen, 2011

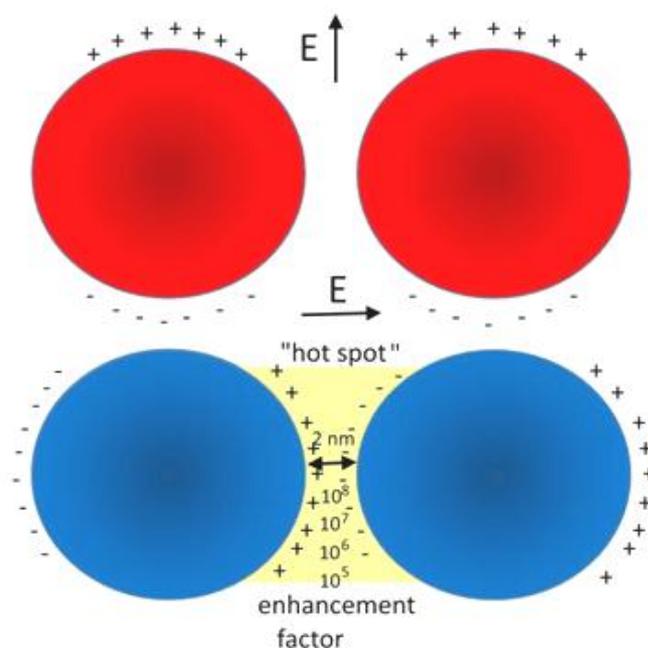
Para que ocorra a transição LSPR é necessária à transferência eletrônica entre a banda de valência de maior energia ocupada para a banda de condução de menor energia vazia. A Figura 9 mostra a evolução na separação entre as bandas de energia com o aumento no número de átomos na superfície da NP.

Outro efeito amplamente estudado para gerar sítios de altíssimo campo local é a utilização de eletrodos com elevada rugosidade, ou mesmo suspensões de NPs agregadas. Esses sítios são conhecidos como “*hot-spots*” e sua reprodutibilidade depende da rugosidade do eletrodo, da quantidade e do tamanho das aglomerações de NPs. Estes são sítios, formados por pares de NPs, alinhadas com o campo elétrico externo, com a molécula adsorvida na região de cavidades, onde a intensificação do campo é representativa, sendo os principais responsáveis pelas intensificações do campo local a ponto de permitir a detecção de uma única molécula. (RU; ETCHEGOIN, 2009) No caso de agregados, é importante que não haja efeito de interferência destrutiva sobre as interações dipolo-dipolo dos plásmons. (KARPOV, 2006)

Cálculos teóricos (ZAMARION, 2012) que preveem a interação entre dois ou mais centros metálicos, têm mostrado que o campo localizado na região entre duas partículas metálicas é muito maior que em um sistema sem interação por parte das mesmas, logo moléculas localizadas entre as NPs possuem uma intensificação muito maior do que moléculas localizadas perto de partículas isoladas (Figura 10).

O campo entre as duas NPs, porém apresentam forte dependência da direção do campo elétrico da luz incidente que precisa possuir componente paralelo ao eixo inter-partícula. (ZAMARION, 2012)

Figura 10: Demonstração gráfica da influência da polarização da luz sobre o *hot spots*



Fonte: Grasseschi; Toma, 2017

Essa é uma observação importante a respeito de aglomerações de partículas; tanto que Rodrigues *et al.* (2015), demonstrou em seu artigo a importância do cálculo dos fatores de intensificação SERS como um dos parâmetros mais importantes que caracterizam a capacidade de um dado substrato para melhorar o sinal Raman para aplicações SERS. (RODRIGUES *et al.*, 2015) Assim como Xu *et al.*, (2000) e Michaels (1999) têm mostrado em estudos de espectroscopia SERS de uma única molécula que são observados espectros apenas quando a molécula adsorvida situa-se entre um par de NPs. (ZAMARION, 2012)

A contribuição apenas da intensificação eletromagnética é, em média, da ordem de  $10^4$  vezes em relação ao efeito Raman normal. Fatores que levam ao aumento dos níveis de adsorção (maior cobertura) ou aumento da afinidade (maiores constantes de equilíbrio para adsorção) não podem ser considerados apenas aprimoramentos químicos. (NATAN, 2006)

Um exemplo de intensificação química seria duas moléculas não ressonantes, que apresentam diferentes intensidades SERS após a correção de coberturas, seções transversais (dependentes de orientação), de modo que a única elucidação restante para tal diferença de intensidades é a interação eletrônica entre o substrato ativo SERS e o adsorvente. Sendo acordado que o efeito eletromagnético é significativamente mais representativo em magnitude. (NATAN, 2006)

### **1.9.2 Modelo químico de intensificação por superfície**

O modelo químico ou molecular considera modificações na polarizabilidade molecular, geradas pela interação da molécula adsorvida com a superfície da NP. Sendo essa dependência relacionada com a estrutura eletrônica da molécula adsorvida.

Essa interação pode ocorrer pela formação de complexos que possuem bandas de transferência de carga entre a NP e a molécula adsorvida, por ligações químicas convencionais com a superfície, ou ainda através de interações eletrostáticas (par iônico). No caso de haver qualquer uma dessas contribuições, o contato com a superfície é essencial e os espectros obtidos dessa maneira podem divergir frente aos registrados da solução, seja por mudanças em intensidades relativas, meias larguras, deslocamentos de frequências ou mesmo pelo desaparecimento ou aparecimento de novas bandas. (FARIA, TEMPERINI E SALA, 1999)

A compreensão desse fenômeno esta diretamente ligada à necessidade de unificar as informações das propriedades eletrônicas, tanto da molécula adsorvida quanto da superfície metálica. (ZAMARION, 2012) Isso significa que a interação metal-adsorbato pode gerar excitações de transferência de carga, onde dependem da proximidade entre os níveis de

energia dos orbitais HOMO (orbital molecular de mais alta energia ocupado, do inglês: *highest occupied molecular orbital*) e LUMO (orbital molecular de menor energia desocupado, do inglês: *lowest unoccupied molecular orbital*) da molécula e do nível de Fermi do metal. (CORIO *et al.*, 1999)

Outra contribuição para a intensificação de espectros Raman é através da contribuição vinda de transições eletrônicas intrínsecas da molécula em ressonância com o laser de excitação, efeito Raman ressonante como descrito no item 1.3, podendo também existir se essa molécula estiver adsorvida na superfície de um metal plasmônico constituindo o chamado efeito SERRS ressonante (*surface-enhanced resonance Raman scattering* - SERRS). (ZAMARION, 2012)

A intensificação química segundo este modelo é da ordem de  $10^2$ . Pode-se considerar que esse efeito é um mecanismo de curto alcance. (FILGUEIRAS, 2013)

Visto que o espectro SERS das moléculas, tem que ser muito bem estudado dependendo da aplicação a que se destina, uma vez que as condições para aquisição e interpretação de espectros SERS dependem do tipo de *hot-spot* criado pela molécula ao interagir com as nanopartículas em diferentes ambientes químicos. (MELO, 2011)

A dificuldade de se interpretar um espectro SERS está no fato do espectro não ser necessariamente fiel à molécula e sim dependente de um conjunto de fatores citados até agora. O desafio então é associar a espectroscopia vibracional de superfície, com a física do estado sólido e a química de coordenação para compreender o sistema como um todo.

#### 1.10. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)

A espectroscopia de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic light scattering* - DLS) permite que os pesquisadores obtenham informações em média sobre um número consideravelmente grande de partículas dentro de um curto período, com medições rápidas e a análise da função de correlação já automatizada. Os volumes de amostra necessários são relativamente ínfimos. (YANG *et al.*, 2015)

Quando a DLS foi introduzida há cerca de 50 anos (denominada na época de "espectroscopia de fóton de correlação" ou "dispersão de luz quase elástica") ficou muito claro, que devido aos trabalhos pioneiros teóricos e experimentais (POIRIER *et al.*, 1998; BRUNGER *et al.*, 1998; FASSHAUER *et al.*, 1997; WEBER *et al.*, 1998), a determinação dos coeficientes de difusão precisos requerem medições dependentes da concentração, dos ângulos e das funções de correlação intensidade-tempo.

Uma vez que as medições de DLS dependentes de ângulos requerem não apenas uma medida de correlação temporal, mas também um goniómetro caro, a DLS foi utilizada apenas por alguns grupos de estudiosos, que, adicionalmente, tiveram de desenvolver procedimentos sofisticados para preparar soluções poliméricas limpas, isto é, sem precipitados. (YANG et al., 2015)

Sendo este último particularmente importante para medições de baixo ângulo porque partículas “precipitadas” poderiam dispersar a luz com maior magnitude, em comparação com grandes ângulos, fornecendo dados incorretos sobre a DLS quando comparado com pequenos ângulos de dispersão. (YANG et al., 2015)

A fim de introduzir DLS para um maior de usuários não especializados, instrumentos de baixo ângulo de custo único foram desenvolvidos e colocados no mercado como "dimensionadores de partículas". Os ângulos de dispersão tipicamente utilizados de 90° ou 173°, isto é, grandes ângulos nos quais a influência de potenciais "contaminantes precipitados" nas funções de correlação passaria a ser menos representativo. Tais instrumentos de baixo custo foram originalmente utilizados por laboratórios industriais para verificar qualitativamente a reprodutibilidade dos lotes de polímero ou de partículas em vez de quantificar os coeficientes de difusão ou os respectivos raios hidrodinâmicos. (YANG et al., 2015)

O movimento aleatório das partículas, Browniano ou térmico, faz com que a DLS a partir de partículas varie com o tempo. Partículas pequenas movem-se mais rapidamente que as maiores, deste modo, a taxa de variação da luz dispersa é mais rápida. (FERNANDES, 2014)

A espectroscopia de correlação de fótons utiliza a taxa de alteração destas flutuações de luz para determinar a distribuição de tamanho das partículas (YE; SINGH, 2007; FERNANDES, 2014).

### 1.11. POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ )

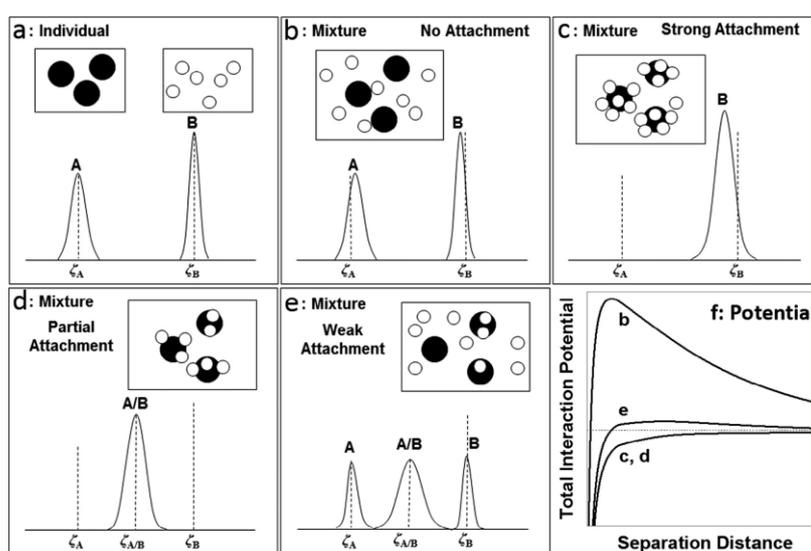
Durante a última década, Xu e Masliyah reconheceram que diferentes partículas poderiam possuir propriedades superficiais diferentes e foram os pioneiros nessa abordagem para caracterizar o potencial de interação entre partículas reais em ambientes dinâmicos. Usando um Zetaphoremeter (Instrumentação CAD, Z3110), a mobilidade eletroforética ou distribuições de potencial  $\zeta$  de sistemas individuais e mistos podem ser medidas para identificar as condições de ligação entre os dois componentes. (WU et al., 2015)

Quando as distribuições de potencial  $\zeta$  de duas espécies de partículas diferentes são distinguíveis (figura 11a), o nível de interação entre os dois tipos de partículas em uma mistura binária pode ser qualitativamente avaliado a partir da resultante  $\zeta$  como demonstrado na figura abaixo. Se as partículas A e B não se atraem, uma distribuição bimodal do potencial  $\zeta$  da mistura com dois picos centrados nas localizações de duas distribuições individuais (únicas) de espécies ( $\zeta_A$ ,  $\zeta_B$ ) como mostradas na fig. 11b. Com as interações hidrodinâmicas de partículas em diferentes mobilidades eletroforéticas, pode-se observar uma ligeira mudança dos picos de distribuição, vulgarmente conhecido como retardamento eletroforético. Se as partículas A e B são fortemente atraentes, as duas distribuições individuais se transformarão em uma única distribuição modal do sistema binário. (WU et al., 2015)

A localização do pico de distribuição único será ou  $\zeta_A$  ou  $\zeta_B$ , dependendo se as partículas A cobrem completamente as partículas B ou vice-versa. Para o exemplo ilustrado na fig. 11c, as partículas B cobrem completamente as partículas A, selecionando a contribuição potencial  $\zeta$  das partículas A. Neste caso, um excesso de componentes individuais B como indicado na inserção da fig. 11c pode existir. Dependendo da razão entre as duas espécies, pode também ser deduzida a interação forte a partir de uma distribuição de potencial  $\zeta$  modal única da mistura binária como mostrado na fig. 11d, encontrando-se o pico em  $\zeta_{A/B}$  que é intermediário para as duas posições de pico de  $\zeta_A$  ou  $\zeta_B$ , correspondendo a picos de distribuição de potencial  $\zeta$  de componentes individuais de A e B, respectivamente. (WU et al., 2015)

Essas características de distribuição de potencial  $\zeta$  de um sistema binário indicam uma cobertura incompleta das partículas A pelas partículas B ou vice-versa, devido principalmente ao número insuficiente de um tipo de partículas disponíveis para cobrir completamente o outro tipo de partículas. Para atrações de partículas mais fracas, é provável que sejam observados dois ou três picos em distribuições potenciais  $\zeta$  de misturas binárias. Figura 11e mostra uma distribuição trimodal que representa a cobertura parcial das partículas A pelas partículas B ( $\zeta_{A/B}$ ) e dois outros picos de distribuição que correspondem a  $\zeta_A$  e  $\zeta_B$  das partículas individuais restantes A e B como resultado da fraca atração e conseqüentemente menos eficiente. Para as atrações fracas, o número e a posição dos picos dependem da força da atração e da razão de número das duas espécies que interagem. (WU et al., 2015)

Figura 11: Possíveis resultados para a ligação de partículas numa mistura binária como determinado a partir da análise de distribuição de potencial  $\zeta$ . (a) Distribuição de dois componentes individuais sobrepostos; (b) distribuição de mistura binária sem atração entre os dois componentes; (c) distribuição de mistura binária com forte atração com componente B recobrindo o componente A; (d) distribuição de mistura binária com forte atração entre os dois componentes, mas componentes insuficientes A para cobrir B ou vice-versa; (e) distribuição de mistura binária com fraca atração onde existem componentes e agregados individuais; (f) representação esquemática do potencial de interação total (teoria DLVO) entre os componentes A e B para os sistemas b, c / d e e, respectivamente.



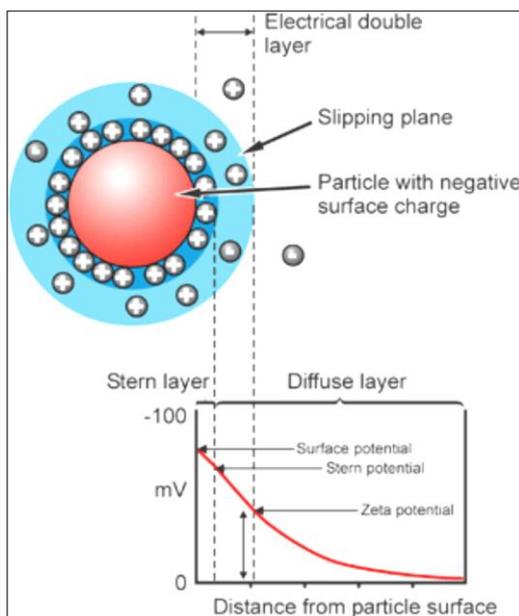
Fonte: WU et al. (2015)

O potencial  $\zeta$  serve também como uma poderosa ferramenta para avaliar a estabilidade dos coloides. Representando nas NPs a carga na superfície das NPs que pode variar de negativo/positivo, bem como em magnitude, de acordo com o agente de revestimento ou dos reagentes utilizados na síntese. (EL BADAWY et al., 2011)

As NPs podem adquirir cargas devido à ocorrência de alguns fenômenos como, possibilidade de íons saírem da partícula e irem para solução, possibilidade de íons saírem da solução e irem para a NP, adsorção preferencial de íons na superfície da NP e ionização de grupos funcionais na superfície da partícula, conforme exemplificado na figura 12. (ADAMSON, 1997)

De acordo com a teoria DLVO, partículas com potencial  $\zeta$  maior que +30 mV e menor que -30 mV são normalmente consideradas estáveis na ausência de estabilizadores estéricos. (FERNANDES, 2014)

Figura 12: Potencial entre a superfície da partícula e o líquido dispersante que varia de acordo com a distância da superfície da partícula.



Fonte: WU et al. (2015)

Sob a ação de um campo elétrico, cada NP e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é denominado de potencial  $\zeta$  (BEDÊ, 2010). O potencial  $\zeta$  não pode ser medido diretamente. Assim, utiliza-se medida indireta, a partir da qual seu valor é calculado. A técnica mais usada e mais aceita é mobilidade eletroforética. Neste caso, uma dispersão coloidal diluída é introduzida em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à dispersão. (FERNANDES, 2014)

As partículas com carga elétrica líquida se movem em direção ao eletrodo de carga contrária, tão rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado. (LAMEIRAS et al., 2008; ABREU, 2011) Por representar a carga efetiva nas partículas, o potencial  $\zeta$  está relacionado com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da dispersão. (BEDÊ, 2010)

### 1.12. ANTIBIÓTICOS

ATBs são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano. (WALSH, 2003)

As bactérias são organismos unicelulares, identificados pela primeira vez por van Leeuwenhoek por volta dos anos 1670, após a invenção do microscópio. Porém, somente no

século XIX a possibilidade destes microrganismos serem causadores de processos infecciosos começou a ser aventada. Esta hipótese surgiu após os experimentos de Louis Pasteur, que demonstrou que algumas linhagens de bactérias eram importantes para processos de fermentação e, também, que as bactérias eram de ampla distribuição pelo meio ambiente. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

Após a segunda metade do século XIX, cientistas como Robert Koch identificaram microrganismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifoide. Nessa época, as pesquisas eram direcionadas para busca de agentes químicos que apresentassem atividade antibiótica. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

O pesquisador Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia, fez uso de substâncias químicas contra infecções, sendo responsável pelos conceitos primários de que uma substância química poderia interferir com a proliferação de microrganismos, em concentrações toleráveis pelo hospedeiro. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

Em 1910, Ehrlich desenvolveu o primeiro ATB de origem sintética, salvarsan (1), usado contra sífilis. Poucos progressos foram conseguidos nos 20 anos seguintes para o desenvolvimento de ATBs, o grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928. (NICOLAOU, 2008)

A atividade da penicilina era superior à das sulfas e a demonstração de que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de ATBs: a prospecção em culturas de micro-organismos, especialmente fungos e actinobactérias. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

### **1.12.1 Penicilinas**

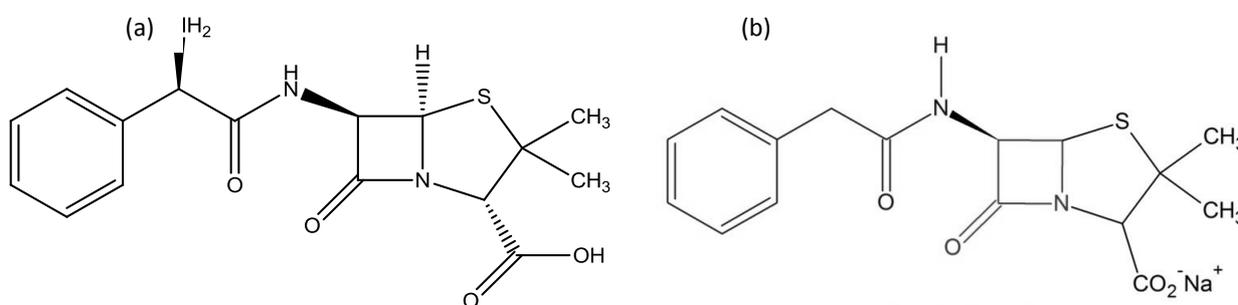
As penicilinas correspondem a uma classe de ATBs constituídos de um núcleo principal formado por um anel tiazolidínico conectado a um anel  $\beta$ -lactâmico, no qual está ligado a uma cadeia lateral. Essa cadeia é responsável pela maioria das propriedades farmacológicas e antibacterianas das penicilinas. Sua ação antibacteriana é resultante da inibição da enzima transpeptidase, que está envolvida, na última etapa da síntese da estrutura da parede celular da bactéria. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

A PG foi descrita em 1929 como agente ATB, porém somente foi introduzida como agente terapêutico nos anos 1940. Após o processo de industrialização da penicilina, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial, foi observado um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos ATBs. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

A AM ou  $\alpha$ -aminobenzilpenicilina ou ácido 6-[D(-) - aminofenilacetamido] penicilâmico é um ATB da classe das penicilinas com estrutura  $\beta$ -lactâmico. Sintetizada em 1987, por Batchelor e col. o qual tornou viável a obtenção do núcleo central das penicilinas através de um mecanismo fácil com elevado rendimento e custo reduzido. Foi a primeira penicilina semi-sintética que mostrou ação contra bacilos gram-negativos abrindo o campo de penicilinas de amplo espectro. As penicilinas utilizadas neste trabalho foram a AM e PG (sendo a PG descrita como ATB isolada e também como benzilpenicilina na associação com o analgésico procaína (BP)). (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

A fórmula estrutural da AM e PG estão representadas na Figura 13:

Figura 13: Fórmula estrutural (a)AM (b) PG



Fonte: próprio autor

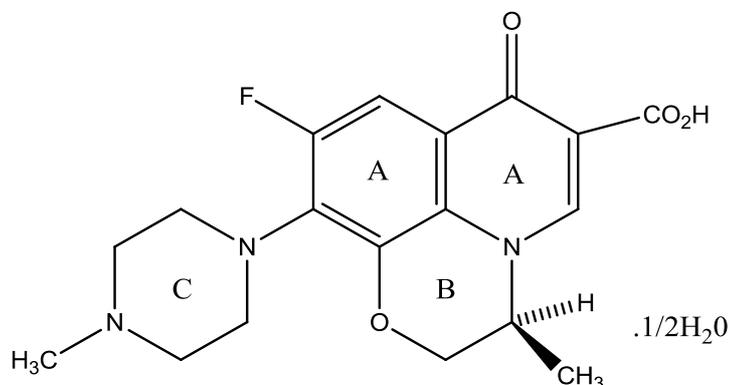
### 1.12.2 Quinolonas

As quinolonas têm sido amplamente utilizadas devido à atividade antibacteriana de largo espectro, elevada potência, resistência não cruzada e baixo preço. As fluoroquinolonas como norfloxacina e levofloxacina (LV), dentre outros, são ATBs muito comuns, (ISLAN et al., 2015) sendo uma das classes mais importantes para tratamento de uma ampla variedade de infecções bacterianas Gram (+) e Gram (-), ao considerar-se suas gerações mais novas como LV, quinolona de 3ª geração. Sua atividade farmacológica está associada ao bloqueio da replicação do DNA da bactéria inibindo a DNA-girase e topoisomerase IV.

A LV é um ATB mais recentemente desenvolvido que tem sido amplamente utilizado para curar doenças infecciosas, como a pneumonia adquirida e a exacerbação aguda da bronquite crônica. A LV é um ATB eficiente, é extremamente resistente à degradação microbiológica e escapa com sucesso dos processos convencionais de tratamento secundário. (LI; WEI; DU, 2015)

A fórmula estrutural da LV está representada na Figura 14:

Figura 14: Fórmula estrutural da LV



Fonte: próprio autor

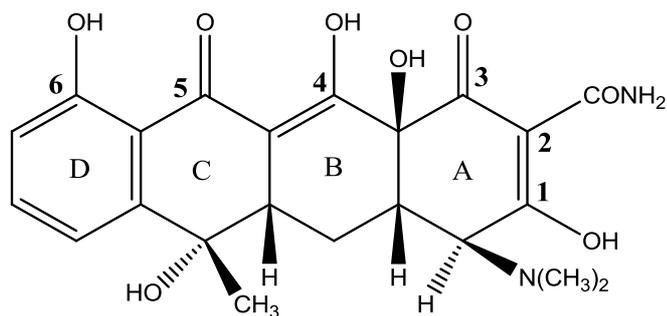
### 1.13.3 Tetraciclina

As tetraciclina são os ATBs mais utilizados, sendo amplamente utilizadas na criação de animais como um ATB veterinário, promotor de crescimento animal e no controle de doenças em seres humanos e animais. (ZHANG et al., 2014) Tendo sido sintetizada pela primeira vez há mais de 60 anos. Sendo uma classe de ATBs de largo espectro produzido por actinomicetos. A partir da tetraciclina (TC) foi sintetizado um grande número de derivados, incluindo clortetraciclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina e tetraciclina de dimetilamina.

A TC (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>•HCl) tem se mostrado de mais fácil absorção para o organismo, sendo utilizado para tratar diversos tipos de infecções bacterianas. TC funciona ligando-se ao sítio A na subunidade 30S do ribossomo bloqueando a ligação do aminoacil-RNAt, inibindo a produção da cadeia peptídica e da síntese bacteriana de proteínas. (JIN et al., 2015)

Devido ao fato de, em sua estrutura química, existir um grande número de possíveis sítios de ligação, as TC se ligam com grande facilidade a íons metálicos. O conhecimento das interações sofridas por este ATB com metais ajuda a melhorar sua atuação em mecanismos fisiológicos específicos. A ligação com AgNPs pode atuar facilitando a entrada das TC no interior das células melhorando sua ação farmacológica. (COUTO, 2011) A fórmula estrutural da TC está representada na Figura 15:

Figura 15: Fórmula estrutural da TC



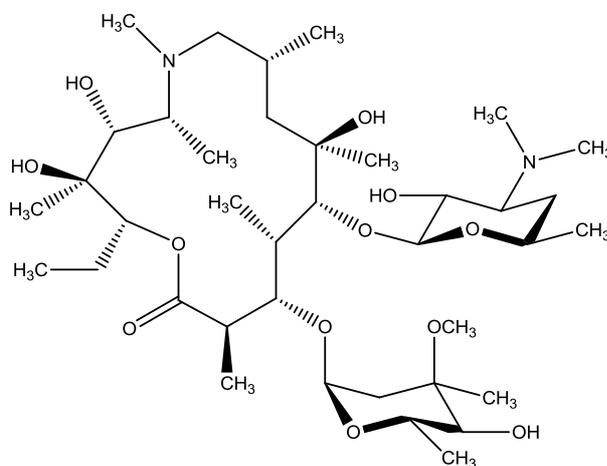
Fonte: próprio autor

#### 1.12.4 Macrolídeo

Os macrolídeos naturais caracterizam-se pela presença de lactonas macrocíclicas de origem policetílica de 14 ou 16 membros, ligadas a um açúcar e um amino-açúcar. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010) Derivados semi-sintéticos podem apresentar anel macrocíclico de 15 membros como azitromicina (AZ).

Os macrolídeos como eritromicina, claritromicina e AZ são muito importantes na medicina humana e animal (TOPP et al., 2016). AZ é o macrolídeo mais utilizado em crianças com doença respiratória crônica por causa dos seus efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios. (ESPADAS et al., 2016). O mecanismo de ação antimicrobiana dos macrolídeos está associado com a ligação reversível à subunidade 50S do ribossomo bacteriano que resulta no bloqueio do alongamento da cadeia peptídica e, assim, na inibição da síntese protéica. (GALVIDIS; LAPA; BURKIN, 2015) A fórmula estrutural da AZ está representada na Figura 16:

Figura 16: Fórmula estrutural da AZ

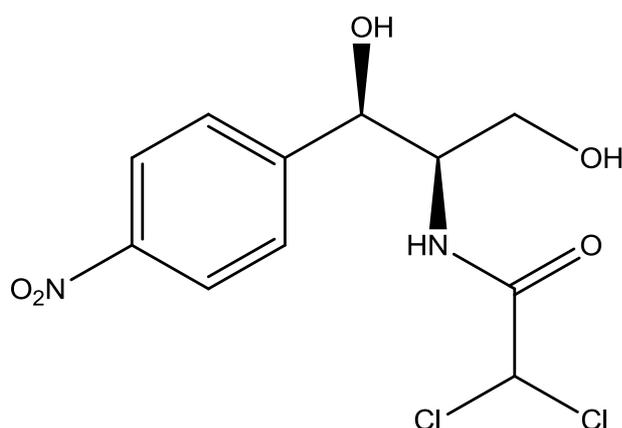


Fonte: próprio autor

### 1.12.5 Cloranfenicol (CL)

O CL foi isolado a primeira vez do microrganismo *Streptomyces venezuela*. Atualmente o CL é sintetizado e somente o isômero R,R é ativo. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010) O CL liga-se à subunidade 30S do ribossomo e parece inibir o movimento dos ribossomos ao longo do mRNA, provavelmente pela inibição da peptidil transferase, responsável pela extensão da cadeia peptídica. Uma vez que o CL se liga à mesma região que os macrolídeos e as lincosamidas, eles não podem ser administrados em associação. Os grupamentos nitro e ambos grupamentos álcool estão envolvidos nas interações. O grupo dicloroacetamida também é importante, porém pode ser substituído por outros grupos eletronegativos. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010) A fórmula estrutural da CL está representada na Figura 17:

Figura 17: Fórmula estrutural do CL



Fonte: próprio autor

### 1.12.6 Cefalosporinas

O cloridrato de cefepime (CE) é uma cefalosporina injetável de 4ª geração. Como todas as cefalosporinas é um ATB β – lactâmico, têm um espectro de ação muito mais alargado para os gram - do que as cefalosporinas da 1ª, 2ª e 3ª geração. Sendo amplamente utilizada no tratamento de infecções bacterianas graves, tais como sepse e neutropenia febril. Sua neurotoxicidade tem sido relatada, e a encefalopatia induzida por CE é caracterizada por deficiência de consciência, alteração do estado mental e movimentos involuntários. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

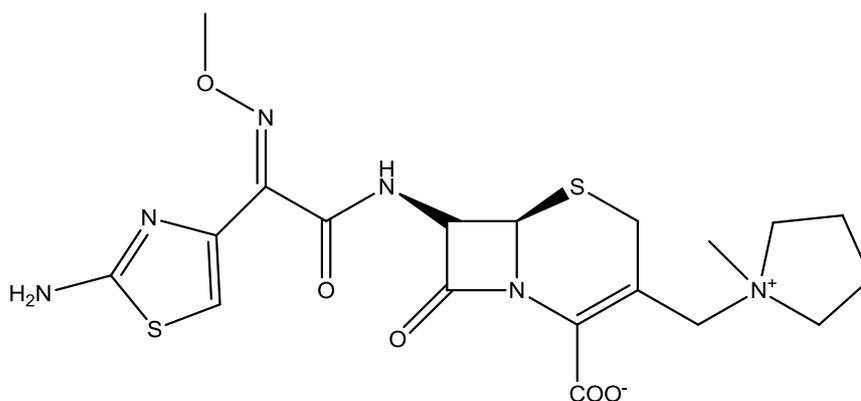
O CE é uma droga com atividade bactericida sobre numerosos microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e enterobactérias, como *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp.*, *Morganella spp.* etc., inclusive cepas produtoras de β - lactamases, responsáveis de sepsias graves ou infecções

nosocomiais, resistentes aos antibióticos tradicionais. É inativo diante de *Bacteroides fragilis* e *Clostridium difficile*. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

O mecanismo de ação é similar aos das outras cefalosporinas, ou seja, inibe a síntese da parede bacteriana celular à qual se liga pela sua grande afinidade com as proteínas ligadoras de penicilina. Não obstante, uma diferença em relação a outras cefalosporinas é sua maior afinidade por receptores da parede dos Gram-negativos; além disso, sua atividade antibacteriana é maior devido ao sítio de ligação satur com menor número de moléculas. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010)

Devido à sua estrutura química, o CE penetra pelas porinas parietais mais rapidamente que outras cefalosporinas (como a ceftazidima e a cefotaxima) razão pela qual esse ATB atinge uma maior concentração nas células bacterianas. Uma hora após a sua administração parenteral, em doses variáveis de 500, 1.000 e 2.000 mg, atingem-se níveis plasmáticos de 21,6, 44,5 e 85,8 mg/ml, respectivamente. Sua meia-vida plasmática é de aproximadamente 2 horas. É difundida com facilidade por diferentes tecidos e é excretada preferentemente (85%) por via renal, mediante filtração glomerular. Seu grau de ligação às proteínas é baixo (20%). A fórmula estrutural da CE está representada na Figura 18:

Figura 18: Fórmula estrutural do CE



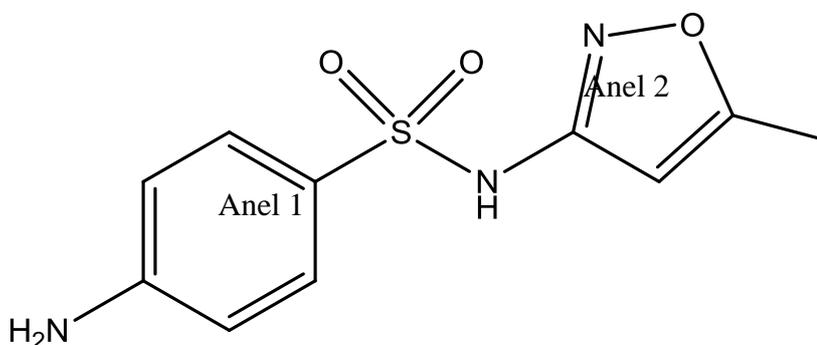
Fonte: próprio autor

### 1.12.7 Sulfonamidas

A sulfacrisoidina foi o primeiro agente antimicrobiano utilizado clinicamente, em 1935, marcando o início da era da terapia antimicrobiana. São bacteriostáticos derivados da sulfanilamida, que têm estrutura similar à do ácido para-aminobenzóico. O grupo das sulfonamidas compreende seis drogas principais: sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, ácido para-aminobenzóico, sulfadiazina e sulfametoxazol (SF), sendo as duas últimas de maior importância clínica. (ANVISA, 2017)

Um exemplo de sulfas ainda utilizada na terapêutica é o SF, em associação com o trimetoprim, para o tratamento de pacientes com infecções no trato urinário e também para pacientes portadores do vírus HIV que apresentam infecções por *Pneumocystis carinii*. Esse ATB atua bloqueando uma etapa do metabolismo do ácido fólico. O SF bloqueia a enzima di-hidropteroato sintetase, presente apenas nas bactérias. As sulfonamidas são, portanto, agentes bacteriostáticos que atuam como antimetabólitos do ácido p-aminobenzoico, substrato para a di-hidropteroato sintetase bacteriana, impedindo a formação do di-hidropteroato e, conseqüentemente, do N5,N10-metileno-tetra-hidrofolato. No presente trabalho foi avaliado o SF. A fórmula estrutural da SF está representada na Figura 19:

Figura 19: Fórmula estrutural do SF



Fonte: próprio autor

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Obtenção e caracterização de AgNPs, avaliação da estabilidade e reprodutibilidade das suspensões obtidas, e estudo da atividade antibacteriana de AgNPs associadas com QBPM e ATBs de interesse clínico, pelo aumento da resistência bacteriana, de forma a correlacionar com dados espectroscópicos que permitam entender o sinergismo observado nas associações.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. - Preparo de suspensões de AgNPs, com diâmetros de ca. 10-30 nm;
- B. - Preparo de suspensões de AgNPs + QBPM;
- C. - Preparo de suspensões de AgNPs + QBPM + ATBs;
- D. - Avaliação da estabilidade das suspensões de AgNPs e do sistema de cultivo frente a variações de pH;
- E. - Avaliação da concentração inibitória mínima das AgNPs, QBPM, e dos ATBs AM, AZ, BP, CE, CL, LV, PG, SF e TC sozinhos e nas sínteses supracitadas;
- F. - Obtenção dos espectros Raman, SERS e UV-VIS-NIR dos ATBs AM, AZ, BP, CE, CL, LV, PG, SF e TC
- G. - Obtenção das análises do potencial  $\zeta$  das AgNPs e QBPM para entender a estabilidade das mesmas.
- H. - Obtenção de análises de DLS das AgNPs e QBPM para facilitar o entendimento e correlação do tamanho das AgNPs e QBPM com a atividade antibacteriana dos mesmos.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados nas sínteses foram de grau analítico e não sofreram prévia purificação. Para a síntese de AgNPs foram utilizados os seguintes materiais: nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$  - Sigma-Aldrich), como estabilizante QBPM ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$  - CAS Peso molecular: 50,000 - 190,000 Da ( $8,3027\text{e}^{-23}$  -  $3,155\text{e}^{-22}$  g) e GD de 75% a 85% - Sigma-Aldrich) e borohidreto de Sódio ( $\text{NaBH}_4$  - Sigma-Aldrich) como agente redutor. Foi utilizada água MilliQ como solvente nas reações, de resistividade igual a 18.2 M $\Omega$ .cm. As vidrarias foram limpas em solução de água regia (3:1;  $\text{HCl}:\text{HNO}_3$ ) e enxaguada abundantemente com água deionizada, sem uso de detergentes ou soluções de limpezas adicionais.

Os antibióticos AM, CE, CL, LV, PG, SF e TC utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich. O antibiótico AZ e BP foram obtidos do Shanghai Modern Pharmaceutical.

#### 3.2. MÉTODOS INSTRUMENTAIS

##### 3.2.1 Espectroscopias Raman e SERS

Os espectros Raman das amostras sólidas foram obtidos utilizando-se o espectrômetro FT-Raman da Bruker, modelo RFS-100, com radiação excitante de comprimento de onda 1064 nm, equipado com detector de germânio resfriado com nitrogênio líquido.

Os espectros SERS foram obtidos utilizando-se o espectrômetro Renishaw InVia Raman Microscope com radiações excitantes de comprimentos de onda 532 nm e 785 nm, ou utilizando espectrômetro Raman da Bruker, modelo Senterra, com radiações excitantes de comprimentos de onda 532 nm, 633 nm e 785 nm, ambos equipados com detector CCD.

##### 3.2.2 Espectroscopia UV-VIS-NIR

Os espectros de extinção das AgNPs e de absorção da QBPM, foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-PC 1800, com lâmpada de tungstênio (infravermelho próximo e visível) e de deutério (ultravioleta), utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm ou 0,5 cm. A varredura dos espectros obtidos variou de 200 a 1100 nm com resolução de 1nm.

### 3.2.3 - Banho ultrassônico

Banho ultrassônico Cristófoli dotado de aquecimento a 65 °C, com capacidade total de 2,5 L e capacidade útil de 2,1 L; frequência: 50/60 Hz; potência: 160 W, 127 V e temporizador com programação de 4 tempos pré-estabelecidos (180 s – 280 s – 380 s – 480 s).

### 3.2.4 Pontencial Zeta e DLS

O espalhamento DLS foi utilizado para medir o tamanho das AgNPs sintetizadas, tendo em vista a distribuição de tamanho da partícula em função de intensidade, área, volume e quantidade. Vale ressaltar que as medidas de espalhamento também foram utilizadas no estudo da estabilidade das AgNPs, mostrando o grau de agregação das mesmas, de acordo com o decorrer do tempo de prateleira.

As medidas de Potencial  $\zeta$  e DLS foram obtidas para medir e entender a carga superficial das AgNPs, através da velocidade da partícula sob um campo elétrico, utilizando-se o aparelho Zetasizer Nano ZS, com faixa de medição de 0,3 nm a 10,0  $\mu$ m de diâmetro, para medição do espalhamento da luz dinâmica. Para análise do potencial zeta, a faixa de medição do equipamento é de 3,8 nm a 100  $\mu$ m (diâmetro) para medição do espalhamento de luz eletroforética. Aparelho pertencente ao Laboratório do Dr Humberto de Mello Brandão da Embrapa – Gado de Leite (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

## 3.3. ESTUDOS DA ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES

As suspensões de AgNPs foram preparadas em conjunto e mantidas em diferentes condições de armazenagem: geladeira de 2°C a 8°C com exposição esporádica a luz, porém em frascos de vidro âmbar, por “2 dias”, “10 dias”, “30 dias” e “60 dias”.

Para a realização dos testes biológicos foram realizados o estudo de estabilidade de 24h e 48h em temperatura ambiente, conforme zona IVa, estabelecida no ICH (*The International Conference on Harmonisation*), clima quente e úmido de 30°C  $\pm$  2°C/ 75%  $\pm$  5% UR.

As medidas UV-VIS-NIR foram realizadas nos tempos de “2 h”, 24 h, “48 h”, “30 dias” e “60 dias”, visto não haver mudanças significativas nas medidas, o prazo não foi estendido. Os testes de potencial Zeta e DLS irão endossar essa avaliação.

## 3.4. SÍNTESES

As AgNPs sintetizadas neste trabalho foram obtidas através da redução do AgNO<sub>3</sub> por NaBH<sub>4</sub>, estabilizadas ou não pelo polímero QBPM. Diferentes rotas e mecanismos de síntese

foram utilizados com a finalidade de obter AgNPs com tamanho adequado para maximizar o efeito antibacteriano, evitando assim variação no tamanho das AgNPs obtidas, mas também com tamanho maiores e sem QBPM para que essas tivessem desempenho SERS com as radiações excitantes em 532 nm e 633 nm. As AgNPs utilizadas nos testes biológicos tiveram a concentração inicial de Ag de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ , pois estas devem seguir as normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) utilizadas nos testes biológicos.

#### **3.4.1 Síntese da suspensão coloidal de AgNP sem QBPM**

O coloide sem QBPM utilizado para os espectros SERS, foi preparado de acordo com o descrito no artigo de Creighton, Blatchford e Albrecht, 1979, onde 10 mL de  $\text{AgNO}_3$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  foi gotejado em 30 mL de  $\text{NaBH}_4$   $2,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  sob banho de gelo.

#### **3.4.2 Sínteses das suspensões coloidais de AgNPs com QBPM**

As suspensões coloidais de AgNPs com diâmetros dentro da faixa desejada, foram obtidas de acordo com alterações realizadas sobre a síntese desenvolvida por Filgueiras, 2013, obtida através da modificação da síntese original do artigo descrito por Grabar et al., 1996. Tipicamente, para os coloides A a M, em 50,0 mL de uma solução de  $\text{AgNO}_3$   $2,10 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  foi adicionado por gotejamento, primeiramente, 5,0 mL de solução de QBPM  $2,2 \text{ gL}^{-1}$  e posteriormente gotejado 0,5 mL de uma solução do agente redutor  $\text{NaBH}_4$   $1,26 \text{ molL}^{-1}$ .

Foi realizado um estudo da reprodutibilidade em diferentes sínteses variando-se a concentração inicial de  $\text{NaBH}_4$  e QBPM, assim como o tipo de agitação utilizada e temperatura. A tabela 1 mostra as proporções de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaBH}_4$  e QBPM, que foram utilizados nas diferentes sínteses dos coloides. As concentrações de  $\text{AgNO}_3$  foram mantidas para atender aos requisitos do CLSI, como já mencionado.

Tabela 1: Proporções de AgNO<sub>3</sub>, NaBH<sub>4</sub> e QBPM nas diferentes sínteses dos coloides

Coloide	AgNO <sub>3</sub> (molL <sup>-1</sup> )	NaBH <sub>4</sub> (molL <sup>-1</sup> )	QBPM (gL <sup>-1</sup> )	Agitação
- Col A	2,10x10 <sup>-3</sup>	2,1x10 <sup>-2</sup>	0,20	Ultrassônica
- Col B	2,10x10 <sup>-3</sup>	2,1x10 <sup>-1</sup>	0,20	Ultrassônica
- Col C	2,10x10 <sup>-3</sup>	4,20x10 <sup>-1</sup>	0,20	Ultrassônica
- Col D	2,10x10 <sup>-3</sup>	8,40x10 <sup>-1</sup>	0,20	Ultrassônica
- Col E	2,10x10 <sup>-3</sup>	1,26	0,10	Ultrassônica
- Col F	2,10x10 <sup>-3</sup>	1,26	0,15	Ultrassônica
- Col G	2,10x10 <sup>-3</sup>	1,26	0,20	Ultrassônica
- Col H	2,10x10 <sup>-3</sup>	1,26	0,25	Ultrassônica
- Col I	2,10x10 <sup>-3</sup>	1,26	0,30	Ultrassônica
- Col J	2,10x10 <sup>-3</sup>	1,26	0,20	Manual - 25°C
- Col K	2,10x10 <sup>-3</sup>	1,26	0,20	Magnética - Ambiente
- Col L	2,10x10 <sup>-3</sup>	1,26	0,20	Magnético - gelo
- Col M	2,10x10 <sup>-3</sup>	1,68	0,20	Ultrassônica

### 3.5. ESPECTROS SERS DOS ANTIBIÓTICOS

As medidas SERS foram utilizadas para o estudo da adsorção química dos ATBs sobre as AgNPs. Utilizou-se a seguinte metodologia, baseada em artigos publicados de 2013 a 2016:

- Preparo de uma solução estoque dos ATBs: AM 1.10<sup>-2</sup> mol/L, AZ 1.10<sup>-2</sup> mol/L, BP 3,7.10<sup>-3</sup> mol/L; CE 1.10<sup>-2</sup> mol/L, CL 3.10<sup>-3</sup> mol/L, LV 1.10<sup>-2</sup> mol/L, PG 3.10<sup>-3</sup> mol/L, e SF 1.10<sup>-3</sup> mol/L, TC 1.10<sup>-3</sup> mol/L.
- 450 µL das AgNPs preparadas de acordo com a síntese de *Creighton* (CREIGHTON, BLATCHFORD E ALBRECHT, 1979) + 50µL do antibiótico 1.10<sup>-2</sup> mol/L;
- Medida SERS dos ATBs adsorvidos sobre AgNPs nas condições de preparo citadas anteriormente;

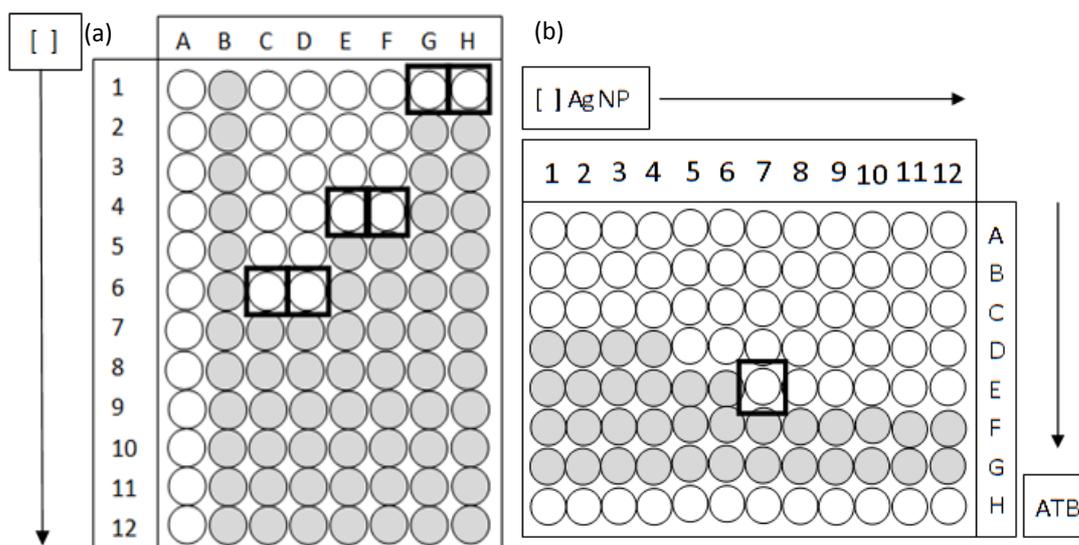
### 3.6. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os testes biológicos foram realizados em colaboração com Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (ICB – UFJF). A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras foi realizada em sistemas de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O teste de CIM é

a concentração mínima de ativo necessária para inibir a multiplicação de um isolado bacteriano. Todos os procedimentos (diluições, manipulação das bactérias, meios de cultura, entre outros) foram realizados segundo recomendações do CLSI, órgão que normaliza testes de susceptibilidade microbiana às drogas.

A figura 20 (a) demonstra o exemplo de um teste de CIM, onde na coluna A é o teste negativo, para se certificar de que o meio de cultura não foi contaminado, a coluna B é o teste positivo, avaliando como o meio de cultura promoveu o crescimento do microrganismo e nas demais colunas são realizados em duplicata o CIM das substâncias. Quando o meio de cultura apresenta turvação é o sinal de crescimento de microrganismo. No teste CIM, a concentração do agente antibacteriano diminui pela metade, linha a linha, desde a linha 1 até a linha 12.

Figura 20: Teste CIM (a) e teste *checkerboard* (b) (círculos brancos “○” indicam meio de cultura livre de crescimento de microrganismos, círculos cinza “●” indicam crescimento de microrganismos e o quadrado “□” indica CIMi (a) ou CIMi-C para *checkerboard*)



Fonte: próprio autor

A ação antibacteriana dos sistemas estudados foi avaliada contra as linhagens bacterianas representativas e de referência cadastradas na *American Type Culture Collection* (ATCC) pertencentes à coleção do ICB. Os microrganismos foram selecionados pela sua relevância clínico-microbiológica, considerando-se já bem conhecida resistência às drogas: *E. coli* ATCC 11229 (modelo de Gram-negativo) e *S. aureus* ATCC 29213 (modelo de Gram-positivo).

A efetividade antimicrobiana das AgNPs + QBPM + ATBs e os brancos utilizados como padrões negativos e positivos foram testados frente a concentrações finais de  $10^6$  UFC/mL (UFC – Unidades Formadoras de Colônia), dos microrganismos escolhidos.

Para a associação das AgNPs + QBPM e AgNPs + QBPM + ATBs foram selecionados TC, LV e AZ, sendo ambos testados em ambas as linhagens escolhidas. A partir de uma solução estoque conhecida de AgNPs ( $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de Ag), QBPM  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  e ATBs: AZ –  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  (ou  $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ), LV –  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  ( $5,53 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ), TC –  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  ( $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ), e foram obtidas diluições variando a concentração de  $0,031 - 64 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  em um sistema de microdiluição em caldo, feito em placa de poliestireno contendo 96 poços de fundo chato.

Todos os meios de cultura para o cultivo bacteriano (Ágar Mueller Hinton) foram preparados utilizando água destilada, pH ajustado e esterilizados em autoclave à  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

O aumento ou diminuição do pH leva a uma diminuição da taxa de reações químicas devido à destruição das enzimas celulares e por consequência afeta a taxa de crescimento e finalmente a sobrevivência do microrganismo. Pode-se considerar que para a maioria das bactérias o pH mínimo para o crescimento é 5,0 e o máximo é 9,0, sendo o ótimo entre 6,0 e 8,0 (neutrófilos).

Os meios de cultura são normalmente ajustados para um pH por volta de 7,0, pois é este o valor geralmente mais vantajoso para o crescimento da maioria das bactérias. Os meios de cultura foram pesados e hidratados conforme instruções do fabricante, o pH acertado para 7,2 e 6,0 com ácido clorídrico e após esterilização o pH foi novamente verificado para conferência. Nesse trabalho foi realizada a avaliação do impacto do pH, para evitar possíveis resultados falso positivos para as soluções testadas.

As placas de microtitulação, para os testes de AgNPs e brancos foram montadas de forma que cada poço tivesse  $300 \mu\text{L}$  de solução, sendo  $150 \mu\text{L}$  de caldo com a suspensão bacteriana e  $150 \mu\text{L}$  de solução de antimicrobiano diluída em caldo Mueller Hinton para os testes de susceptibilidade.

As AgNPs e brancos testados foram adicionados aos poços das placas de microtitulação, e através do método de diluição seriada foram obtidas as concentrações desejadas para a determinação da CIM, que variavam de  $0,031 \mu\text{g/mL}$  até  $128 \mu\text{g/mL}$ .

Como controle de qualidade, foram avaliados os valores de CIM dos ATBs individualmente, para os microrganismos teste em relação aos padrões estabelecidos pelo CLSI.

As linhagens bacterianas utilizadas foram descongeladas, estriadas em placas de ágar BHI e incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 24 h. Após esse processo, foi realizada a inoculação de 4,0 mL do meio Mueller Hinton, através do preparo da suspensão das bactérias na escala 0,5 Mac Farland, incubadas novamente em estufa microbiológica a 37°C por 24 h. Após esse processo, 0,3 mL do meio incubado foi pipetado para novo tubo contendo 3,0 mL de meio Mueller Hinton estéril. Da suspensão bacteriana foram transferidos os 150 µL para serem semeados nos poços.

As placas multipoços, após inoculação, foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h. O crescimento bacteriano foi determinado através da turbidez do meio e também com posterior replicação em placas cotendo 3 a 5 mL de meio BHI, em cada placa de poliestireno de fundo chato, resfriado em temperatura ambiente, sobre fluxo laminar. O meio possuía espessura homogênea de 3 a 4 mm. Nas placas foram avaliadas a ação bactericida ou bacteriostática dos antimicrobianos.

As análises foram feitas em triplicada e a menor concentração de antimicrobianos que não apresentou crescimento bacteriano foi determinada como CIM. As CIMs das AgNPs, da QBPM, ATBs e brancos foram obtidas para os materiais isolados, foram testados também variando-se as concentrações e valores de pH e diferentes ácidos.

Para avaliação de ação sinérgica, aditiva ou antagônica entre as composições AgNPs + QBPM ou AgNPs + QBPM + ATBs, foi utilizado o método de *Checkerboard* (OLIVEIRA et al., 2016) método usado para se obter a Concentração Inibitória Fracionada (CIF). Como demonstrado na figura 23 (b), a linha G é o teste positivo enquanto a linha H é o teste negativo. Sendo o resultado verificado como no teste CIM.

Neste caso, as placas de microtitulação, foram montadas de forma que cada poço tivesse 50µL de AgNPs + QBPM e 30 µL de solução de antibióticos diluídos em 70µL de caldo Mueller Hinton, completando os poços com 150 µL de caldo com a suspensão bacteriana para os testes de susceptibilidade.

As substâncias testadas foram adicionadas aos poços das placas de microtitulação. As concentrações desejadas para a determinação da CIM, variaram de 0,031µg mL<sup>-1</sup> até 128 µg mL<sup>-1</sup> para AgNPs + QBPM e de 0,031µg mL<sup>-1</sup> até 64 µg mL<sup>-1</sup> para os antibióticos.

Os ATBs foram adicionados em concentrações decrescentes no sentido vertical (de cima para baixo). As AgNPs foram adicionadas em concentrações decrescentes, porém no sentido horizontal (da esquerda para direita). Desta forma, cada poço apresentou uma combinação diferente de cada composto.

Serão consideradas sinérgicas as interações com CIF menores ou iguais a 0,5. Serão consideradas aditivas as interações com CIF 0,5 e  $\leq 1,0$ . As interações entre 1,0 e 2,0 (inclusive) serão consideradas indiferentes, e as maiores que 4,0 antagonicas. (OLIVEIRA et al., 2016)

A CIF das amostras será calculada da seguinte forma:

$$\text{CIFA} = \text{CIMA combinação} / \text{CIMA Substância isolada}$$

$$\text{CIFB} = \text{CIMB combinação} / \text{CIMB B isolada}$$

$$\text{CIFindex} = \text{CIFA} + \text{CIFB}$$

onde A = ATB e B = AgNPs + QBPM

**Equação 6**

### 3.7. PREPARO DOS ATBS PARA OS TESTES BIOLÓGICOS

Os ATBs AM, BP, CE, CL, LV, PG e SF foram dissolvidos em água em pH 10,0, posteriormente o pH foi ajustado com HAc 0,5 %v para pH 6,0. TC, QBPM e QMPM dissolvido em água a pH 3,0, depois o pH foi ajustado com NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> para pH 6,0. CE, PG, BP, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e BH<sub>4</sub><sup>-</sup> foram dissolvidos diretamente em água e o pH teve valor 6,0. AZ solubilizado em álcool etílico PA depois acertada concentração com água e pH para 6,0.

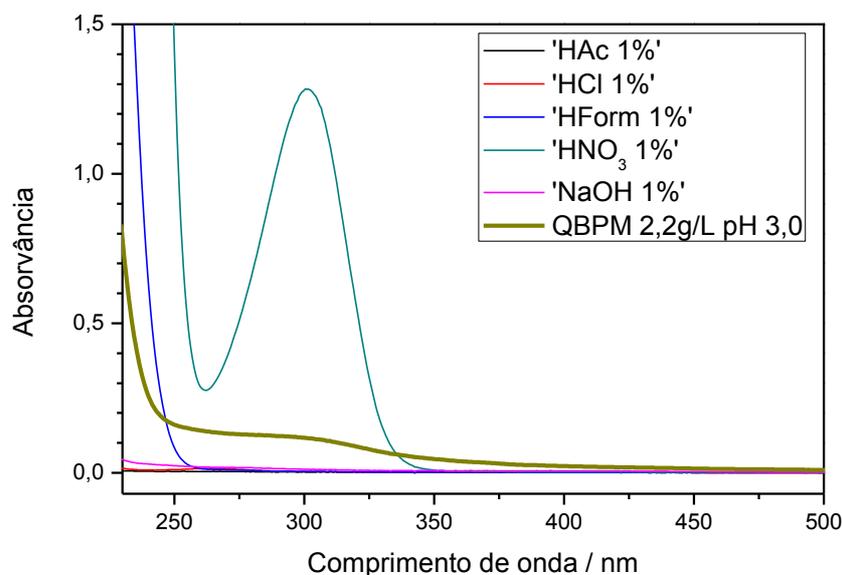
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 PREPARO DA QBPM

#### 4.1.1 Seleção dos ácidos utilizados para solubilização da QBPM

As soluções de ácido acético (HAc) 1 %v, ácido clorídrico (HCl) 1 %v, ácido fórmico (HForm) 1 %v e ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 1 %v foram analisadas por espectroscopia UV-VIS, para verificação da existência de banda de absorção na mesma região que a QBPM, que impossibilitasse monitorar a solubilização e ajustar o pH da mesma. A QBPM 2,2g/L foi solubilizada em solução de HAc 1 %v, como demonstrado na figura 21.

Figura 21: Espectros UV-VIS das soluções aquosas dos ácidos, do NaOH e da QBPM (caminho óptico: 5mm)



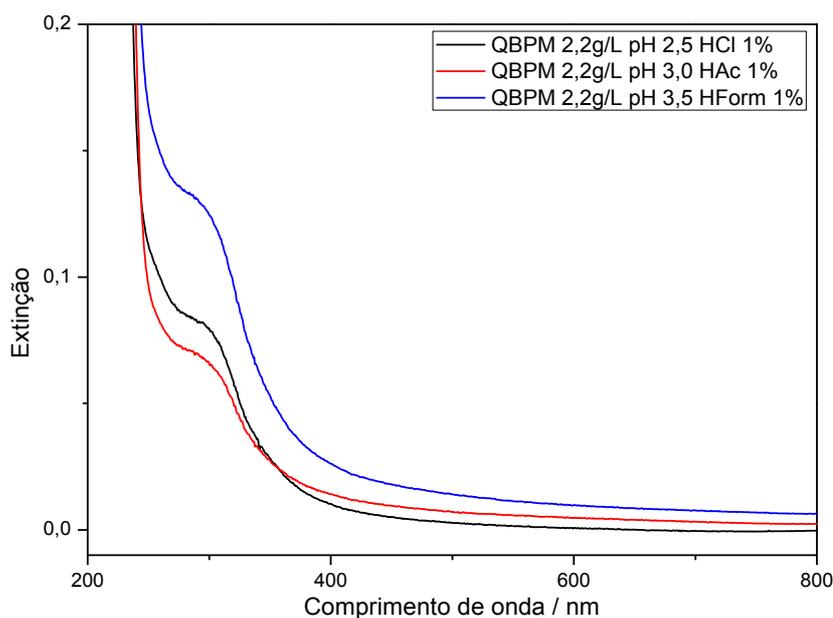
Fonte: próprio autor.

Das quatro soluções ácidas a 1%v analisadas, a única com banda de absorção na mesma região que a QBPM, que inviabilizaria o monitoramento da solubilização foi o HNO<sub>3</sub>. Para os demais ácidos não existe banda de absorção na mesma região, assim como para o hidróxido de sódio (NaOH), cujo espectro UV-VIS também está representado na figura 21 e será utilizado nos próximos experimentos para ajuste de pH do coloide e da solução de QBPM 2,2 g/L.

### 4.1.2 Definição do ácido

Para avaliar qual o melhor ácido para solubilização da QBPM, preparou-se soluções aquosas de QBPM 2,2 g/L em HAc 1,0%v, pH 3,0; em HCl 1,0% v, pH 2,5 e em HForm 1,0% v, pH 3,5, e foram obtidos os espectros UV-VIS, figura 22.

Figura 22: Espectros de extinção da suspensão de QBPM em diferentes ácidos  
(caminho óptico: 5 mm)



Fonte: próprio autor.

Verificou-se que a solubilização da QBPM foi maior em solução de HAc (menor espalhamento na região do ultravioleta), sendo este definido como ácido de escolha para solubilização, previamente também foi realizada uma pesquisa bibliográfica, onde foi constatado que na maioria dos artigos publicados de 2015 a 2017, o ácido de escolha utilizado para solubilização da QBPM foi o HAc.

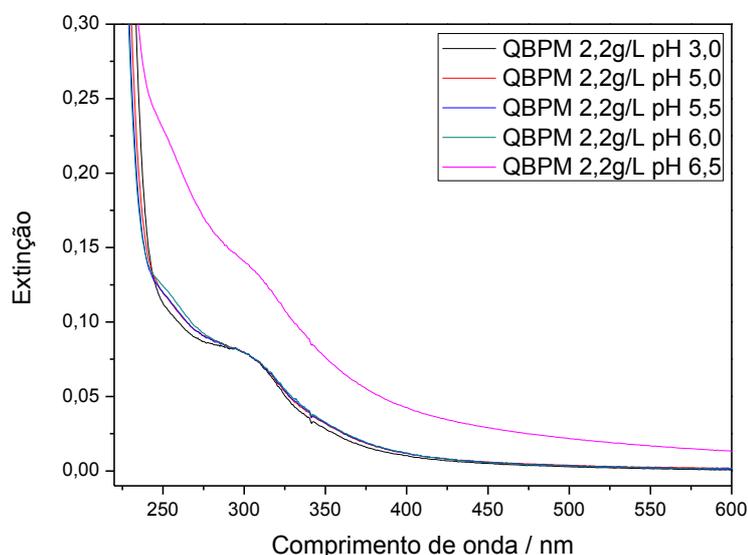
### 4.1.3 Solubilização da QBPM

Preparou-se 100 mL de solução mãe de QBPM 2,2 g/L em HAc 1,0%v, pH 3,0. A solução mãe foi então fracionada em 04 (quatro) alíquotas de 25 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, adicionado gota a gota com agitação magnética. Abaixo encontra-se a tabela 2 com descrição das informações. Foi realizado UV-VIS, figura 23, para comprovação da solubilização e ausência de espalhamento, que indicaria precipitação do polímero.

Tabela 2: Ajuste de pH da QBPM com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>

Amostra	pH inicial	Volume gasto de NaOH 1,0% (μL)	pH final
01	3,0	420	5,0
02	3,0	970	5,5
03	3,0	1.310	6,0
04	3,0	1.800	6,5

Figura 23: Espectros de absorção da QBPM em função do pH (caminho óptico: 5 mm)



Fonte: próprio autor.

Acima de pH 5,5 foi necessário reduzir a velocidade de gotejamento visto que ao gotejar o NaOH, a precipitação da QBPM se iniciava, com turvação da solução, porém após alguns minutos a turvação desaparecia. Em pH 6,5 já foi verificado presença de precipitado e corpo de fundo. Visto que o pKa da QBPM é 6,3, já era esperada a ocorrência dessa precipitação. O aumento da linha base no espectro em pH 6,5 pode ser explicado pela presença de material particulado gerando maior espalhamento da luz. Deste modo, o pH 6,0 foi escolhido como referência para o pH dos coloides, da suspensão de QBPM e dos testes biológicos.

#### 4.2 SÍNTESE DAS AgNPS COM CONCENTRAÇÃO DE $Ag^+ > BH_4^-$ (COLOIDE COL A)

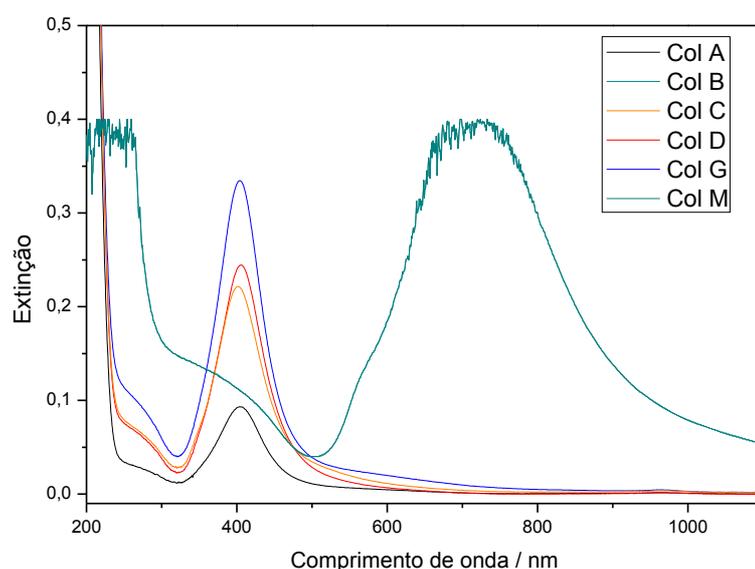
A figura 24 mostra o espectro UV-VIS das AgNPs preparadas de acordo com a síntese descrita para o col A.

A banda LSPR do Col A apresenta um máximo de absorção em 400 nm e nenhuma absorção na região do vermelho do espectro visível o que é característico de AgNPs pequenas (10 – 30 nm), que são adequadas para a realização dos testes biológicos, porém por haver menor proporção de agente redutor para reduzir toda  $\text{Ag}^+$  em  $\text{Ag}^0$ , não foi definida como síntese de escolha.

#### 4.3 SÍNTESE DAS AgNPS COM CONCENTRAÇÃO DE $\text{Ag}^+ \leq \text{BH}_4^-$ (COLOIDE COL B - M)

A figura 24 mostra o espectro de extinção das AgNPs em 6 amostras de coloides preparadas de acordo com o item 4.2 e conforme a síntese descrita para os Col B, Col C, Col D, Col G e Col M. Variando a concentração do agente redutor  $\text{BH}_4^-$ , de acordo com *Van Hyning e Zukoski (1998)*.

Figura 24: Espectros UV-VIS normalizados (ordem 10x) das AgNPs preparadas de acordo com modificação na síntese descrita por *Filgueras et al (2013)* e *Van Hyning e Zukoski (1998)*. Caminho óptico: 5 mm; diluição:10x



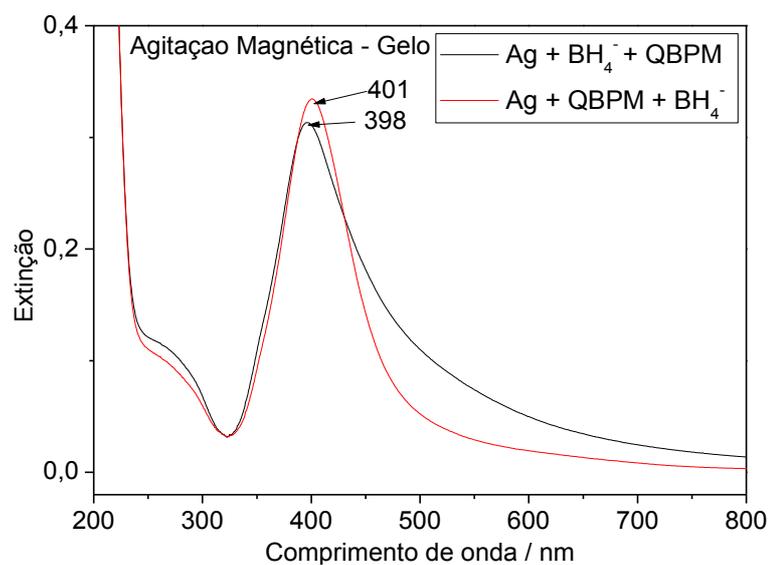
Fonte: próprio autor

Conforme aumenta a relação molar  $\text{BH}_4^-$  Vs  $\text{Ag}^+$ , há um aumento de intensidade da luz espalhada, indicando aumento do número de AgNPs formadas, porém acima da proporção molar de 1 de  $\text{Ag}^+$  para 6 de  $\text{BH}_4^-$ , já há agregação das AgNPs. Como pode ser visto no espectro do Col M. Conforme descrito por *Van Hyning e Zukoski (1998)*, e comprovado nos espectros acima, o coloide é mais estável na relação molar 6  $\text{BH}_4^-$  p/ 1  $\text{Ag}^+$  (Col G).

### 4.3.1 - Síntese das AgNPs com diferentes mecanismos de preparo

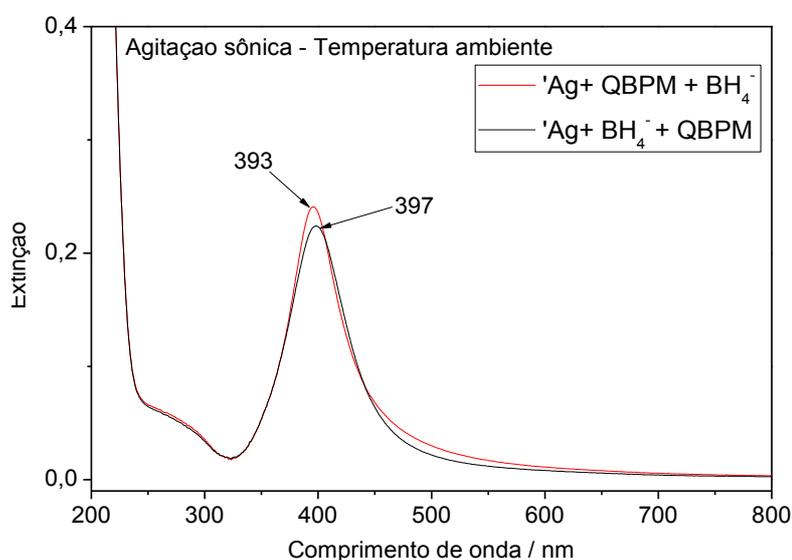
As figuras 25, 26, 27 e 28 mostram os espectros UV-VIS das AgNPs em 2 amostras de coloides preparadas de acordo com a síntese descrita para os Col G, Col J, Col K e Col L. Variando a ordem de adição, invertendo entre o agente estabilizador – QBPM e agente redutor  $\text{BH}_4^-$ .

Figura 25: Espectros UV-VIS do Col L preparadas com agitação magnética em banho de gelo. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x



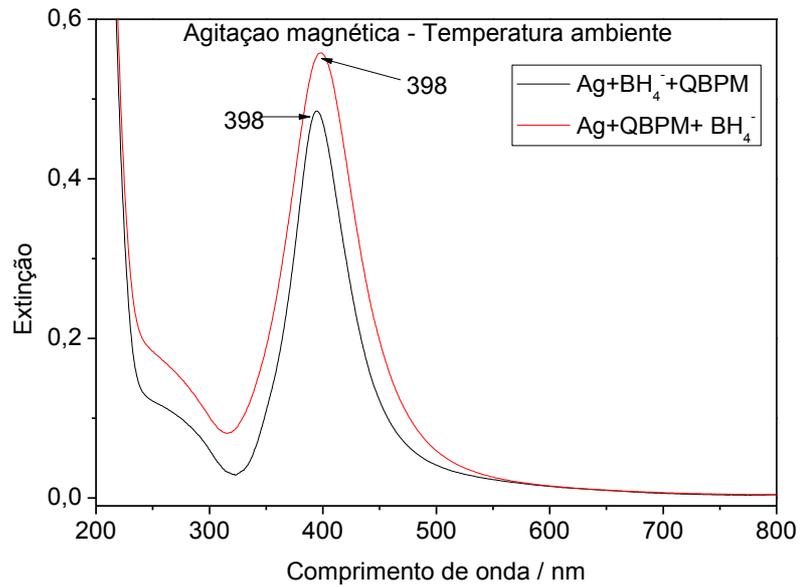
Fonte: próprio autor

Figura 26: Espectros UV-VIS do Col G preparados com agitação ultrassônica em temperatura ambiente. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x



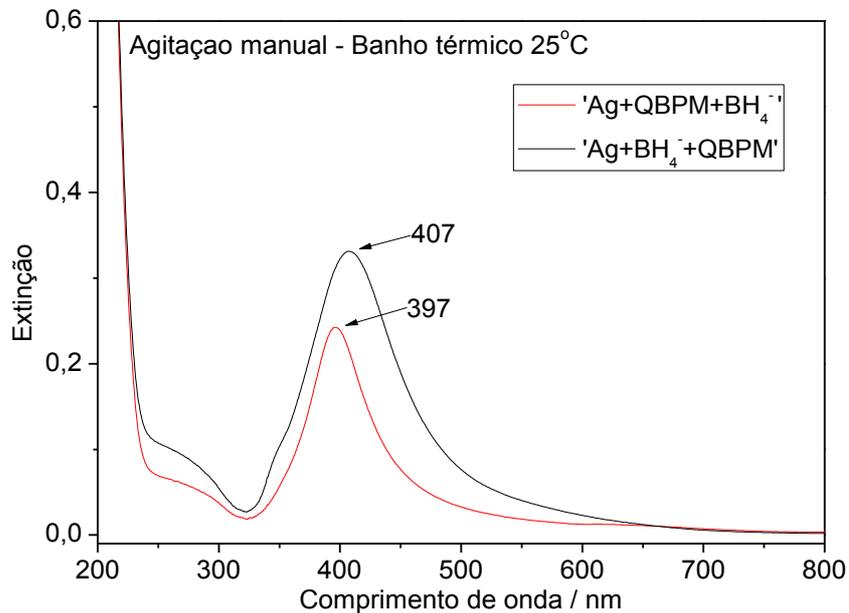
Fonte: próprio autor

Figura 27: Espectros UV-VIS do Col K preparadas com agitação magnética em temperatura ambiente. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x



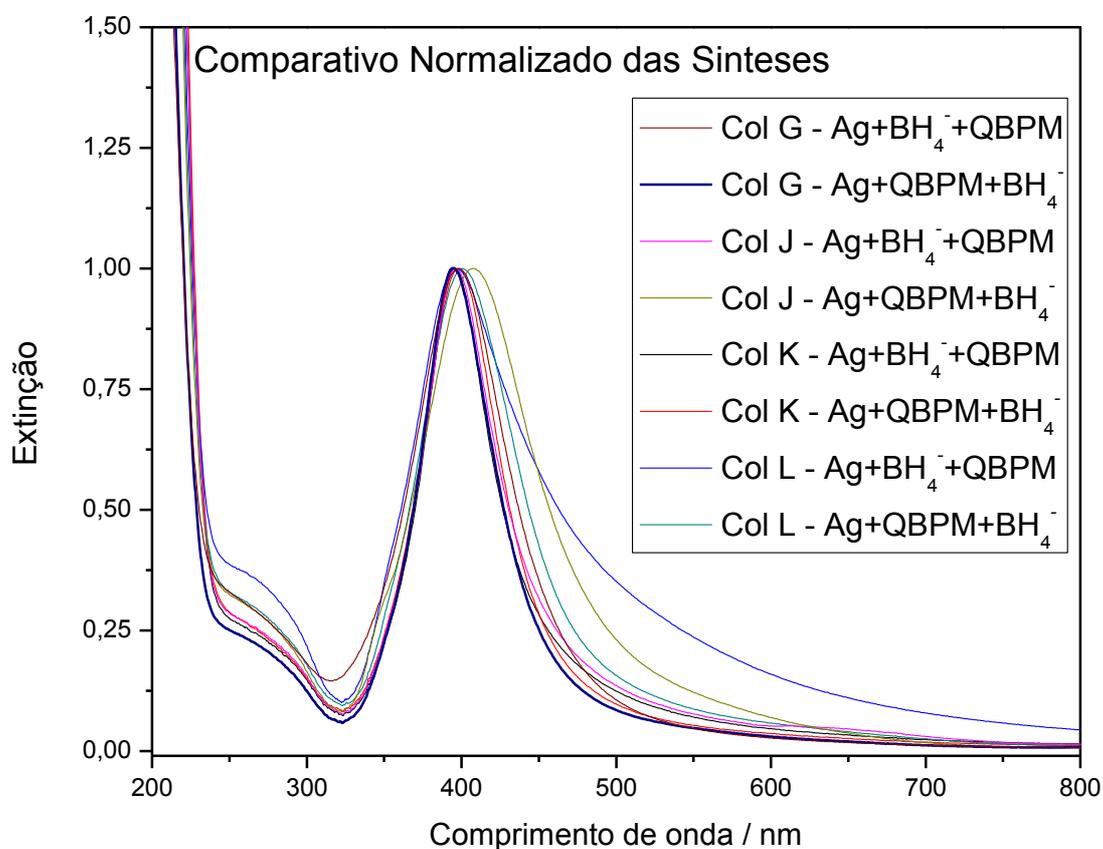
Fonte: próprio autor

Figura 28: Espectros UV-VIS do Col J preparadas com agitação manual em banho térmico a 25°C. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x



Fonte: próprio autor

Figura 29: Espectros UV-VIS normalizados, das AgNPs preparadas com diferentes tipos de agitação e diferentes temperaturas. Caminho óptico: 5mm; diluição:10x



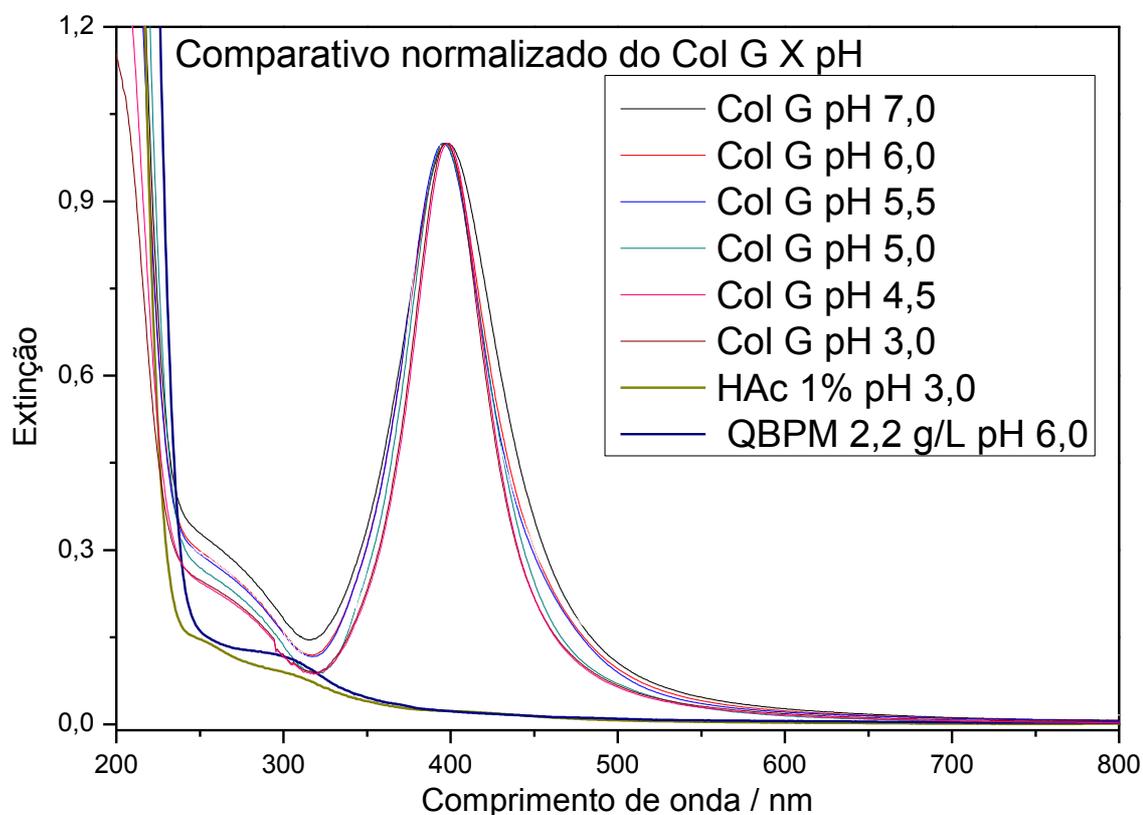
Fonte: próprio autor

Através das figuras 25, 26, 27 e 28 nota-se que a adição de QBPM antes do agente redutor, leva à obtenção de AgNPs com banda LSPR próxima de 390 nm e nenhuma absorção na região do vermelho do espectro visível que é um padrão espectral característico de AgNPs pequenas, cerca de 10 nm, (GARCÍA-BARRASA, LÓPEZ-DE-LUZURIAGA E MONGE, 2011) que são adequadas para a realização dos testes biológicos. De acordo com a figura 29 que apresenta a normalização dos espectros e comparação das sínteses é possível perceber que a síntese com maior *blueshift* é a aquela com adição de agente estabilizador antes do agente redutor utilizando agitação ultrassônica, sendo escolhida então para o restante dos experimentos.

#### 4.3.2 – Ajuste de pH do Col G

A figura 30 mostra os espectros de extinção das AgNPs em 6 amostras do Col G, de absorção da QBPM 2,2 pH 6,0 e HAc 1%. Variando o pH do meio desde pH ácido até pH neutro.

Figura 30: Espectros UV-VIS normalizado do Col G X pH. Caminho óptico: 5 mm; diluição:10x



Fonte: próprio autor

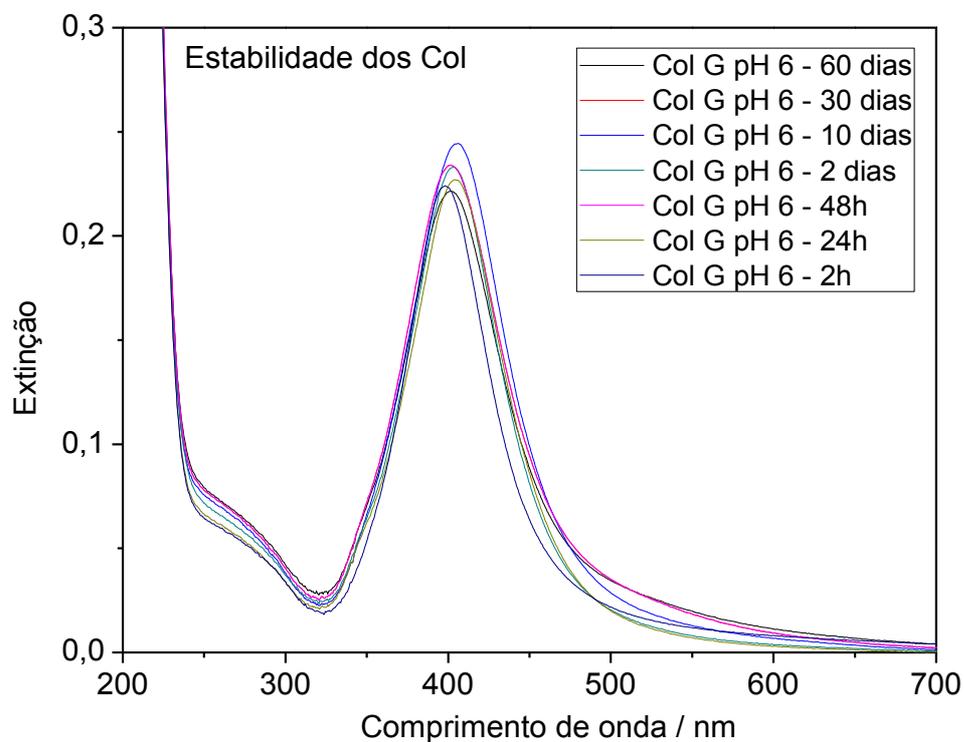
\* Espectros de QBPM 2,2 g. L-1 e HAc 1% não foram normalizados.

Através da figura 30 verificou-se que o ajuste de pH não interfere no tamanho das AgNPs, também foi possível verificar que em pH 7,0 a estabilidade do Col G é alterada, sendo estável por curto período de tempo, em função da precipitação da QBPM em pH acima de 6,0, o que é possível verificar com aumento da intensidade relativa da banda da QBPM.

#### 4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES

As medidas UV-VIS foram realizadas nos tempos de “2h”, 24h, “48h” em temperatura ambiente, assim como após armazenamento em geladeira por “2 dias”, “10 dias”, “30 dias” e “60 dias”. Não foram verificadas alterações significativas nos máximos de absorção e perfil das curvas, sendo assim, chegou-se a conclusão de que a suspensão de AgNPs possui boa estabilidade. Os itens 4.5 e 4.6 ajudam a endossar essa teoria.

Figura 31: Espectros UV-VIS do Col G para avaliação da estabilidade. Caminho óptico: 5 mm; diluição:10x



Fonte: próprio autor

#### 4.5 MEDIDA DE POTENCIAL $\zeta$

A medida de potencial  $\zeta$  serviu para analisar a carga de superfície assim como a interação entre as AgNPs sintetizadas com e sem QBPM. Avaliando o tipo de interação existente entre ambas, de forma a entender a capacidade de estabilização da QBPM e a capacidade para acompanhar as AgNPs no transporte dos ATBs.

Todas as medidas foram realizadas em temperatura de 25°C, em célula zeta descartável, com 100 corridas zeta e posição de medida de 2,0 mm, e os resultados estão apresentados na tabela 3, abaixo,

Tabela 3: Potencial  $\zeta$  das amostras

Amostra	Medidas	Pot. $\zeta$ (mV)	Pico princ. (mV)	Área (%)
QBPM 2,2 g/L pH 4,0 – tempo “0”	1	-0,06	-19,40	58,20
	2	0,15	-13,60	56,20
	3	0,12	-18,00	51,60
	Média	0,07	-17,00	55,33
Col G pH 3,0 – tempo “0”	1	36,70	31,60	41,80
	2	39,10	47,10	59,60
	3	38,60	38,40	90,70
	Média	38,13	56,47	46,60
Col G pH 5,0 – Tempo “0”	1	41,20	41,30	99,50
	2	42,30	42,30	100,00
	3	42,90	42,90	100,00
	Média	42,13	42,16	99,83
Col G pH 5,0 – 3 meses	1	26,30	27,40	95,40
	2	29,00	29,00	100,00
	3	27,00	27,00	100,00
	Média	27,43	27,80	98,47
Col G pH 6,0 – 3 meses	1	35,50	37,00	93,60
	2	34,90	34,90	100,00
	3	35,30	26,90	58,70
	Média	35,23	32,93	84,10
Col G pH 6,0 S/ QBPM – tempo “0”	1	-45,60	-45,60	100,00
	2	-47,00	-47,00	100,00
	3	-47,70	-47,70	100,00
	Média	-46,77	-46,77	100,00
Col A pH 5,0 tempo “0”	1	-0,08	6,88	60,60
	2	-0,29	5,11	58,70
	3	0,12	4,44	77,40
	Média	-0,08	5,48	65,57
Col A pH 6,0 – Tempo “0”	1	-	-	-
	2	0,46	38,40	12,10
	3	-0,47	118,00	9,80
	Média	-0,01	78,20	10,95
AgNO <sub>3</sub>			-25,3 mV	

\* Análise realizada a partir do pico principal.

Através da análise em triplicata do potencial  $\zeta$  a QBPM em pH 4,0 possui 4 picos, sendo o principal e mais representativo apresentado em -17 mV.

A solução de AgNO<sub>3</sub> apresenta potencial  $\zeta$  de -25,3 mV em água. Pela figura 11 quando os picos de cada componente aparece como único pico na mistura, indica forte interação. Podemos então inferir que para o Coloide G em pH 3,0 há uma forte atração da QBPM

recobrando as AgNPs. Além de que o potencial  $\zeta$  conforme *Elbadawy*, (1941), quando superior a + 30,0 mV tornam o meio estável. Sendo assim comprovamos que no Col G a QBPM serviu como um bom estabilizante.

O potencial  $\zeta$  do Col G em pH 5,0 no tempo zero e após 3 meses de estabilidade, mostrou uma redução do potencial  $\zeta$ , porém sem comprometer a estabilidade, passando de + 42,9 mV para + 27,0 mV, possuindo um tempo adequado de prateleira para ser utilizado em experimentos biológicos. A oscilação do potencial  $\zeta$  pode estar ligado ao movimento browniano do coloide, passando de recobrimento total para recobrimento parcial das AgNPs.

O Coloide G em pH 6,0, assim como em pH 5,0 mostrou forte atração da QBPM com recobrando das AgNPs, comprovando a capacidade de atuar como estabilizante. Seu potencial após 3 meses, mostrou ser de + 35,0 mV, tendo boa adequabilidade para aplicações biológicas e estudos futuros.

O Col G sem QBPM apresentou uma inversão do potencial  $\zeta$  passando de + 35,0 mV, para uma carga negativa - 46,77 mV nas análises realizadas em triplicata, mostrando boa estabilidade, porém a curto prazo, visto que após 7 dias em geladeira já foi verificado agregação do coloide.

O Col A em pH 5,0 e pH 6,0 apresentou comportamento bem aleatório quando comparado aos demais, devido ao fato de possuir íons  $\text{Ag}^+$  não reduzidos a  $\text{Ag}^0$ , não sendo alvo do presente trabalho não foi avaliado a influência e impacto dessa relação.

#### 4.6 ESPALHAMENTO DLS

O espalhamento DLS foi utilizado para medir o tamanho das partículas presentes no coloide, tendo em vista a distribuição do tamanho da partícula influenciar nos testes biológicos. Vale ressaltar que as medidas de espalhamento também foram utilizadas no estudo da estabilidade das AgNPs, mostrando o grau de agregação das mesmas, de acordo com o decorrer do tempo de prateleira. A suspensão de QBPM foi avaliada como comparativo para o Col G, estando descrito na tabela abaixo.

Tabela 4: Intensidade do espalhamento DLS

Amostra	Tamanho médio (nm)			Médio
	1	2	3	
<b>QBPM 2,2 g/L pH 4,0 – tempo “0”</b>	1234,970	1087,580	1101,340	1141,297
<b>QBPM 2,2 g/L pH 6,0 – tempo “0”</b>	374,353	353,512	357,985	361,950
<b>Col G pH 3,0 - tempo “0”</b>	36,350	36,015	36,086	36,150
<b>Col G pH 5,0 – tempo “0”</b>	79,999	84,242	76,274	80,172
<b>Col G pH 5,0 – 3 meses</b>	142,937	143,474	140,018	142,143
<b>Col G pH 6,0 – 3 meses</b>	74,966	73,791	73,777	74,178
<b>Col G pH 6,0 S/ QBPM – tempo “0”</b>	450,511	444,875	420,388	438,591
<b>Col A pH 5,0 – tempo “0”</b>	60,678	49,444	45,930	52,017
<b>Col A pH 6,0 – tempo “0”</b>	235,948	232,206	232,144	233,433

Na suspensão de QBPM em pH 4,0, a molécula tende a ter maior número de grupamentos amina protonados, com isso possuindo maior repulsão de cargas positivas, fazendo com que a cadeia polimérica fique mais aberta e com geometria menos globular, apresentando um tamanho médio de 1141,297 nm. Já a suspensão de QBPM em pH 6,0, apresenta um comportamento esperado, onde a QBPM tende a ter menor número de grupamentos amina protonados, com isso menor repulsão de cargas positivas, fazendo com que a cadeia polimérica fique menos aberta e com geometria mais globular, sendo tal inferência comprovada pelo tamanho médio que reduziu para 361,950 nm.

Como já afirmado em momentos anteriores nessa dissertação, o pKa da QBPM é 6,3, comprovando que a protonação das aminas realmente está ligada a solubilização do polímero assim como o comportamento conformacional do polímero.

O Col G em pH 3,0 apresentou tamanho médio de partícula por volta de 30 nm adequado para os testes biológicos. O Col G em pH 5,0 após três meses possui um comportamento semelhante ao descrito para o Col G em pH 3,0, tendo o pico principal relacionado com a QBPM e o ombro secundário relacionado com a presença de AgNPs que não interagiram com a QBPM (Anexo A).

Como já descrito para o Col G em pH 5,0, no pH 6,0 a QBPM estará menos protonada, fazendo com que a cadeia polimérica esteja mais entrelaçada, tendo um espalhamento inferior ao pH 5,0 devido a aproximação das cadeias. Sendo verificado também o ombro na análise por volta de 30 nm, referente a AgNPs (Anexo B).

Como demonstrado nas análises acima, pode-se verificar que a QBPM realmente funciona como um ótimo estabilizante e como já descrito no item 4.3.1 a QBPM adicionada antes do agente redutor, leva a obtenção de AgNPs com menores tamanhos de partícula, o que é indicado para os experimentos biológicos.

#### 4.7 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

##### 4.7.1 – Ajuste de pH do meio

Para verificar o impacto do pH do meio de cultura e dos ácidos utilizados para correção do pH da solução de QBPM e Col G, foi realizado o seguinte experimento, onde em 3,0 mL de meio ágar Mueller Hinton, ajustou-se o pH para as faixas conforme descrito na tabela 5, com as soluções descritas na mesma, neste meio foi adicionado 0,3mL de meio ágar Mueller Hinton com suspensão bacteriana.

Tabela 5: Impacto do pH sobre o meio de cultura

Ácido	Concentração da solução de ácido	pH do meio após adição de 0,15mL da solução ácida	E. Coli	S. Aureus
HCl	1,0%	Entre 3 e 4	-	-
	0,1%	Entre 5 e 6	+	+
HNO <sub>3</sub>	1,0%	Entre 3 e 4	-	-
	0,1%	Entre 4 e 5	-	-
HAc	1,0%	Entre 4 e 5	-	-
	0,1%	Entre 5 e 6	+	+
<b>Controle negativo</b>		Entre 7 e 8	-	-
<b>Controle positivo para <i>E. Coli</i></b>		Entre 7 e 8	+	+
<b>Controle positivo para <i>S. Aureus</i></b>		Entre 7 e 8	+	+

\*pH aferido em fita colorimétrica de pH; sinais de (+) e (-) indicam que houve crescimento e não houve, respectivamente.

Pode se inferir com o experimento, se o pH do meio ficar abaixo de 5,0, a própria acidez do meio já possui ação antimicrobiana. Como os meios são preparações que possuem na sua fórmula nutrientes, carboidratos entre outras substâncias que provém as condições necessárias para o crescimento dos microrganismos inoculados, alterações no pH podem alterar a conformação de proteínas e desnaturar os nutrientes e carboidratos, além de afetar a

osmolaridade dos microrganismos. Como já demonstrado nas sínteses dos coloides e na solubilização da QBPM é necessário e possível trabalhar com o pH mais próximo do neutro.

#### 4.7.2 – Avaliação do impacto do pH

O crescimento e sobrevivência dos microrganismos é muito influenciado pelo pH do meio de cultura e cada espécie tem a capacidade de crescer dentro de um intervalo (mínimo, ótimo e máximo) específico de pH. Objetivou-se avaliar se ao adicionar as substâncias testes, poderia haver interferência do meio no crescimento dos microrganismos. As tabelas 6 e 7 apresentam os valores de CIM em  $\mu\text{g/mL}$  e atividade bactericida ou bacteriostática das suspensões de AgNPs ou de QBPM, comparando o impacto do pH do meio de cultura, quando ajustado para 6,0 ou 7,2 (este último é o valor indicado pelo fabricante como o pH do meio de cultura, preparado conforme rotulo).

Tabela 6: Valores de CIM para o meio de cultura com pH ajustado para o valor 6,0 (pH ajustado com HCl 1,0M)

Agentes testados ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>E. coli</i> (11229)		<i>S. Aureus</i> (29213)	
	Bacteriostático	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida
Col A	32,0	32,0	32,0	64,0
Col G	32,0	32,0	32,0	64,0
QMPPM	176,0	704,0	176,0	352,0
QBPM	176,0	176,0	176,0	704,0

Tabela 7: Valores de CIM para o meio de cultura em pH 7,2 conforme preparo do fabricante

Agentes testados ( $\mu\text{g/mL}$ )*	<i>E. coli</i> (11229)		<i>S. Aureus</i> (29213)	
	Bacteriostático	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida
Col A	32,0	32,0	32,0	64,0
Col G	32,0	32,0	32,0	64,0
QMPPM	352,0	352,0	352,0	704,0
QBPM	176,0	176,0	88,0	176,0

\*Substâncias testadas em pH 7,2, apresentavam pH em 6,0.

Através da análise dos resultados das tabelas 6 e 7 é possível inferir que mesmo se o pH do meio de cultura, abaixar para 6,0 não haverá impactos e interferências do pH nos resultados dos testes biológicos.

#### 4.7.3 – Concentração Inibitória Mínima - CIM

A tabela 8 apresenta os resultados obtidos para a atividade antibacteriana, através dos valores de CIM em  $\mu\text{g/mL}$  com relação à atividade da substância desafiada quanto à função bactericida ou bacteriostática. Foram testadas as substâncias utilizadas na síntese dos

coloides, para avaliar a interferência ou não nos testes, e os ATBs que serviram também como controle do experimento de acordo com a CLSI.

Respeitando as regras do CLSI, a concentração dos ATBs, AgNO<sub>3</sub>, QBPM, QMPM e coloides tiveram a concentração final a 0,2 g/L. Para BH<sub>4</sub><sup>-</sup>, QBPM, QMPM, AM, AZ, BP, CE, CL, LV, PG, SF e TC a escala de concentrações foi expandida na tentativa de se descobrir o valor de CIM.

Tabela 8: Testes biológicos de CIM avaliado para os brancos e substâncias testadas (pH 6,0)

Agentes testados (µg/mL)	<i>E. coli</i> (11229)		<i>S. Aureus</i> (29213)	
	Bacteriostático	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida
<b>Sol. HAc 0,5%**</b>	>128,0*	>128,0*	>128,0*	>128,0*
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	16,0	32,0	16,0	16,0
<b>BH<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	>1408,0*	>1408,0*	>1408,0 *	>1408,0*
<b>QMPM</b>	176,0	704,0	176,0	352,0
<b>QBPM</b>	176,0	176,0	176,0	704,0
<b>Col A</b>	32,0	32,0	32,0	64,0
<b>Col E</b>	64,0	64,0	64,0	64,0
<b>Col F</b>	64,0	64,0	64,0	64,0
<b>Col G</b>	32,0	32,0	32,0	64,0
<b>Col H</b>	32,0	32,0	32,0	64,0
<b>Col I</b>	32,0	32,0	32,0	32,0
<b>Coloide G s/QBPM</b>	>128,0*	>128,0*	>128,0*	>128,0*
<b>Norfloxacino</b>	2,0	2,0	1,0	2,0
<b>AM"</b>	32,0	32,0	32,0	32,0
<b>AZ</b>	0,2	0,2	1,0	1,0
<b>BP"</b>	>1280,0*	>1280,0 *	>1280,0*	>1280,0 *
<b>CE"</b>	16,0	32,0	16,0	16,0
<b>CL"</b>	256,0	256,0	>256,0	>256,0
<b>LV</b>	0,5	1,0	0,2	0,2
<b>PG"</b>	8,0	8,0	64,0	64,0
<b>SF"</b>	640,0	>1280,0 *	640,0	>1280,0*
<b>TC</b>	0,5	1,0	1,0	1,0

\* Primeira concentração da placa, onde foram colocados 192,0 µL da solução testada e 108,0 µL do meio, necessário avaliar concentração acima para verificar o CIM.

\*\* A solução de HAc 0,5% na concentração testada, tem o soluto todo ionizado, pKa do HAc 4,76.

Valores CIM (µg.mL<sup>-1</sup>) para: *E.coli* não constam no CLSI, 2015 para a cepa 11229 utilizada no teste biológico. Para *S aureus* cepa 29213 o CIM padrão deve estar entre AM 0,5 – 2,0; AZ 0,5-2; CE 1-4; CL ND; LE 0,06-0,5; TE 0,12-1,0.

Através da análise e interpretação da tabela 8, avaliando os valores de CIM e relação bactericida ou bacteriostática das substâncias testadas, podemos concluir que houve interação positiva na associação das AgNPs com a QBPM, visto que o CIM para a associação foi menor do que o avaliado para as substâncias isoladas, reduzindo no caso da Ag de 128,0 µg/mL para 32,0 µg/mL e no caso da QBPM de 176,0 µg/mL para 32,0 µg/mL. Com relação ao aumento

da concentração de QBPM nas AgNPs, não houve diferença significativa nos resultados, sendo assim mantido a relação de 0,2g/L de Ag<sup>0</sup> e 0,2g/L de QBPM.

A solução de HAc 0,5% m com pH 6,0 demonstrou não ter ação como antimicrobiano. Já o AgNO<sub>3</sub> demonstrou ter boa ação antimicrobiana, como já descrito na literatura (KOLLEF, 2008), porém devido a sua toxicidade, a aplicação do mesmo só é indicada para superfícies inanimadas.

No comparativo entre QBPM e QMPM foi possível verificar que a QMPM possui uma ação antimicrobiana mais eficaz contra Gram-positiva que as QBPM, como já bem descrito na literatura (KUMAR et al., 2004).

Os ATBs AZ, TC, LV e Norfloxacino apresentaram CIM dentro das faixas especificadas pelo CLSI, mostrando que o teste é exato e reproduzível. Sendo assim para o teste de *Checkerboard* os ATBs testados foram AZ, TC e LV. Tendo a AZ apresentado melhor resultado para cepas Gram negativas, enquanto a LV apresentou melhor resultado para as cepas Gram positivas.

Para os ATBs AM, BP, CE, CL, PG e SF não foram realizadas avaliações AgNPs + QBPM + ATBs, devido ao resultado dos testes CIM dos ATBs isolados terem apresentado valores de CIM acima da faixa padronizada pelo CLSI, valores esses que foram atribuídos aos ATBs já estarem fora do prazo de validade especificado pelo fabricante, podendo então estar com teor abaixo do rotulado. Para a Norfloxacino não foi realizado investigações devido a já possuir vasta gama de artigos científicos publicados utilizando esse ATB.

#### **4.7.4 – Resultado do *Checkerboard***

As tabelas 9 a 11 apresentam os resultados obtidos para a atividade antibacteriana das associações de AgNPs + QBPM e AgNPs + QBPM + ATB's, para *E. coli* e *S Aureus*, através dos valores de CIM em µg/mL. Avaliando a ação sinérgica, aditiva ou antagônica das composições, de forma a se obter a CIF. Os ATBs foram adicionados em concentrações decrescentes no sentido vertical (de cima para baixo). As AgNPs foram adicionadas em concentrações decrescentes, porém no sentido horizontal (da esquerda para direita). Desta forma, cada poço apresentou uma combinação diferente de cada composto.

Para se considerar uma associação aditiva o valor de CIF deve ser menor que 0,5, as interações com CIF 0,5 e ≤ 1,0. As interações entre 1,0 e 2,0 (inclusive) serão consideradas indiferentes, e as maiores que 4,0, antagônicas. Os resultados de CIF das associações estão demonstrados nas tabelas 10 e 12.

#### 4.7.4.1 Checkerboarder para *E. Coli*

Tabela 9: Cálculo de CIF das amostras p *E. Coli*

Agentes testados ( $\mu\text{g/mL}$ )	Combinação	Droga isolada	Resultado
AgNPs	32,0 (AgNPs)	128,0	0,250
QBPM	32,0 (AgNPs)	176,0	0,182
Col G	0,06 (AZ)	32,0	0,002
Col G	1,0 (LV)	32,0	0,031
Col G	1,0 (TC)	32,0	0,031
AZ	0,0312	0,2	0,156
LV	0,125	0,5	0,250
TC	0,0625	0,5	0,125

Tabela 10: CIF *Index* das amostras

Agentes testados ( $\mu\text{g/mL}$ )	Col G	Resultado
QBPM	0,432	Sinergismo
AZ	0,158	Sinergismo
LV	0,281	Sinergismo
TC	0,156	Sinergismo

#### 4.7.4.2 Checkerboarder para *S. Aureus*

Tabela 11: Cálculo de CIF das amostras p *S. Aureus*

Agentes testados ( $\mu\text{g/mL}$ )	Combinação	Droga isolada	Resultado
AgNPs	32,0 (QBPM)	128,0	0,250
QBPM	32,0 (AgNPs)	176,0	0,182
Col G	0,06 (AZ)	32,0	0,002
Col G	1,0 (LV)	32,0	0,031
Col G	1,0 (TC)	32,0	0,031
AZ	0,0312	1,0	0,031
LV	0,125	0,2	0,625
TC	0,0625	1,0	0,062

Tabela 12: CIF *Index* das amostras

Agentes testados ( $\mu\text{g/mL}$ )	Col G	Resultado
QBPM	0,432	Sinergismo
AZ	0,033	Sinergismo
LV	0,656	Aditivo
TC	0,093	Sinergismo

As Tabelas 10 e 12 mostram os padrões de susceptibilidade das estirpes Gram negativas (*E. Coli*) e Gram positivas (*S. Aureus*) testadas para a combinação de AgNP + QBPM + ATB e os valores calculados de CIF index.

Foram observadas interações sinérgicas entre AgNP + QBPM + ATB contra estirpes Gram-negativas de *E. coli* combinadas com AZ, LV e TC. De forma semelhante, ao sinergismo presente nos ensaios com cepas Gram positivas de *S. aureus* combinadas com AZ e TC, já para a LV o efeito apresentado foi apenas aditivo.

Verificamos assim que para o tratamento de doenças causadas por bactérias Gram negativas e ou Gram positivas, a AZ e a TC mostraram ter praticamente o mesmo efeito na associação proposta, sendo a diferença na pontuação pouco relevante para definição da melhor droga.

#### 4.8 ESPECTROSCOPIA SERS

Os espectros SERS foram obtidos com a finalidade de analisar e estudar a geometria de adsorção dos ATBs estudados sobre a superfície metálica, visto influenciar no transporte da droga, causando assim sinergismo na atividade biológica. Os ATBs escolhidas foram avaliados por apresentarem aromaticidade contendo ou não átomos de enxofre, oxigênio ou nitrogênio, para possível coordenação com os átomos metálicos da superfície das AgNPs, devido à natureza do adsorbato ser um importante fator na observação do efeito SERS.

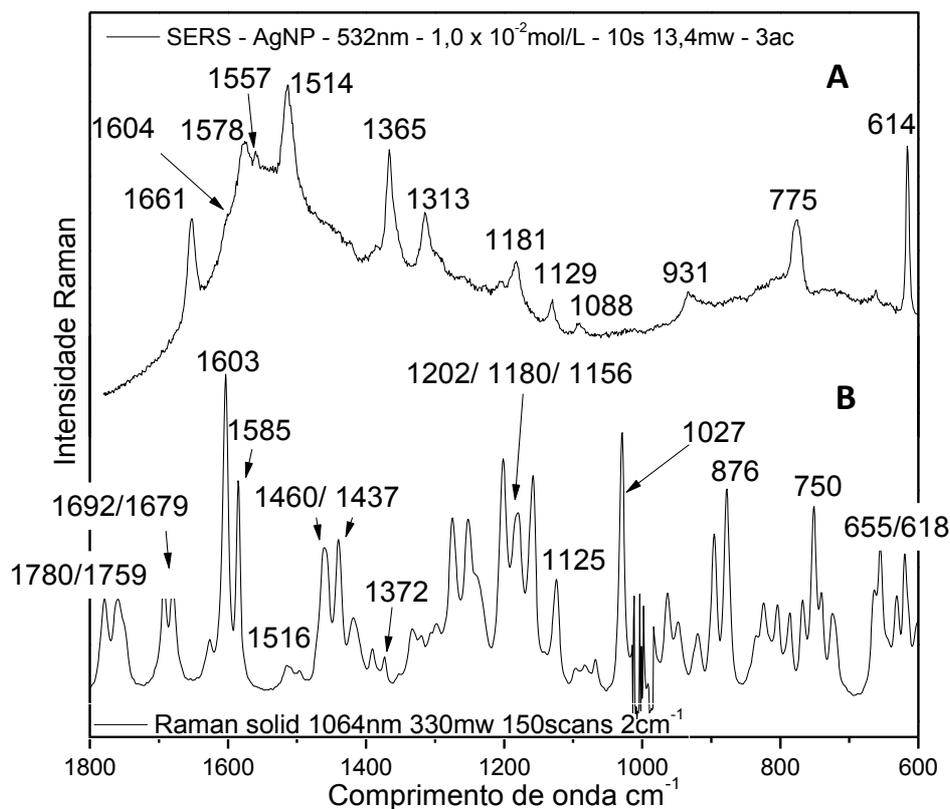
Para as análises SERS, foram utilizadas AgNPs sintetizadas conforme descrito por *Creighton* (CREIGHTON, BLATCHFORD E ALBRECHT, 1979) , visto o Col G possuir na sua composição QBPM, macromolécula que interfere no sinal SERS.

Para todos os ATBs realizou-se experimento para analisar o impacto da potência do laser sobre o espectro Raman do sólido, para certificar-se de que a potência do laser não levaria à fotodecomposição dos analitos. Podemos inferir que a potência do laser não causa alteração nem deslocamento dos picos observados para os espectros, apenas há alteração na intensidade da banda vibracional.

##### 4.8.1 Ampicilina (AM)

A fórmula estrutural da AM esta ilustrada na figura 13 (a), e espectros SERS e Raman sólido estão demonstrados abaixo, nas figuras 32, 33 e 34 respectivamente.

Figura 32: A) Espectro SERS da AM  $1.10^{-2}$  mol/L e B) Espectro Raman da AM sólida



Fonte: Próprio autor

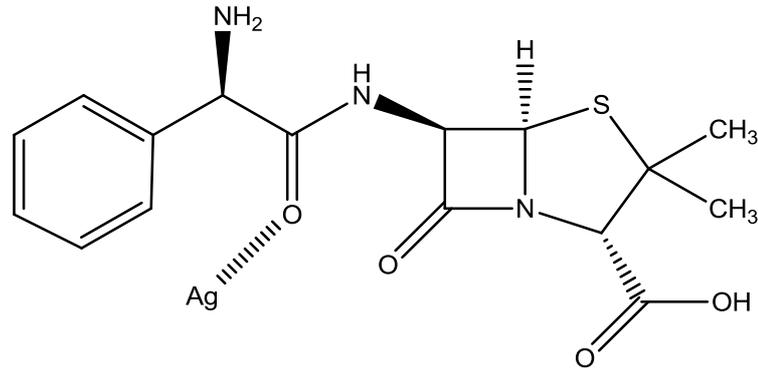
Na tabela 13 estão apresentadas as atribuições vibracionais da AM para o espectro Raman e SERS, assim como referencial bibliográfico.

Tabela 13: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da AM (valores em  $\text{cm}^{-1}$ )

Experimentos		Literatura (BARALDI et al., 2014)	Tentativa de atribuição
Raman sólido – 1064 nm	SERS – 532nm	Raman sólido – 628,8nm	
1759/ 1780	-	1766	$\nu$ (CO) $\beta$ - lact
1679/ 1692	1661	1693	$\nu$ (CO)amida + $\delta$ (NH)
1603	1604sh	1604	$\nu$ (CC)fe + $\delta$ CH(fe) + $\delta$ (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
1585	1578	1584	$\nu$ (NH)amina
1516	1514	-	$\nu$ (CN)amida + $\delta$ NH
1460/ 1437	-	1437	$\nu$ (CC)fe + $\delta$ (CH)fe + $\delta$ (CH <sub>3</sub> /CH)
1372	1365	1368	$\nu$ (C-COO <sup>-</sup> )
750	775	754	$\tau$ (CNCO)lactam -fp
618/655	614	640	$\tau$ (CNCO)lactamfp

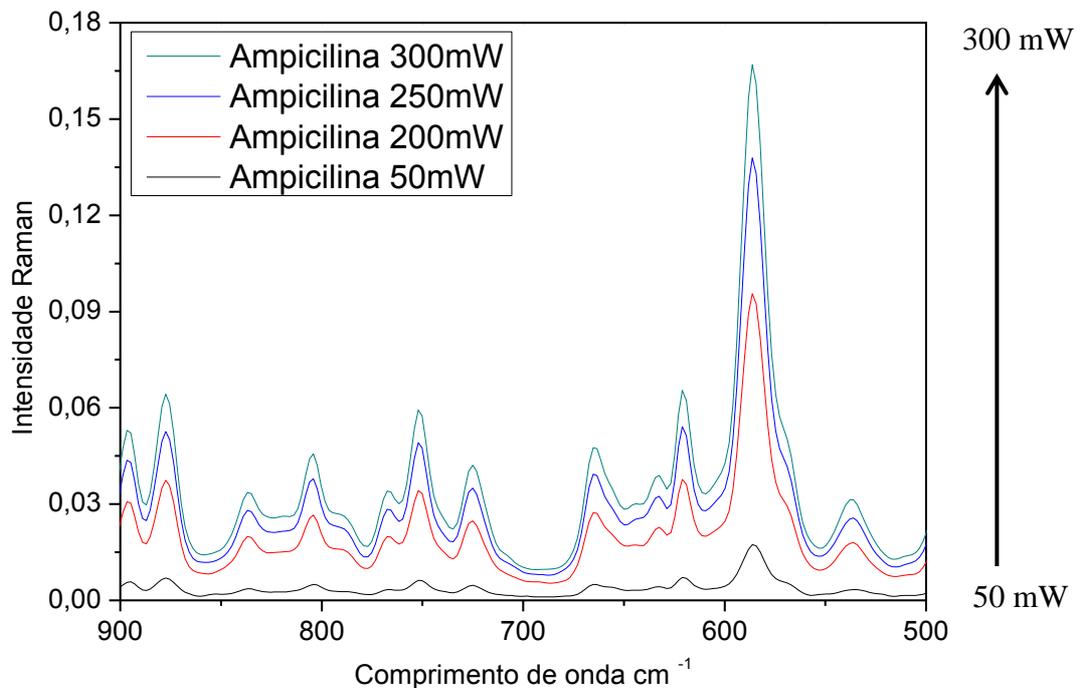
$\nu$  = estiramento;  $\delta$  = variação de ângulo; fp = fora do plano,  $\tau$  – torção; fe – fenil; sh – ombro.

Figura 33: Geometria de adsorção da AM



Fonte: Próprio autor

Figura 34: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.



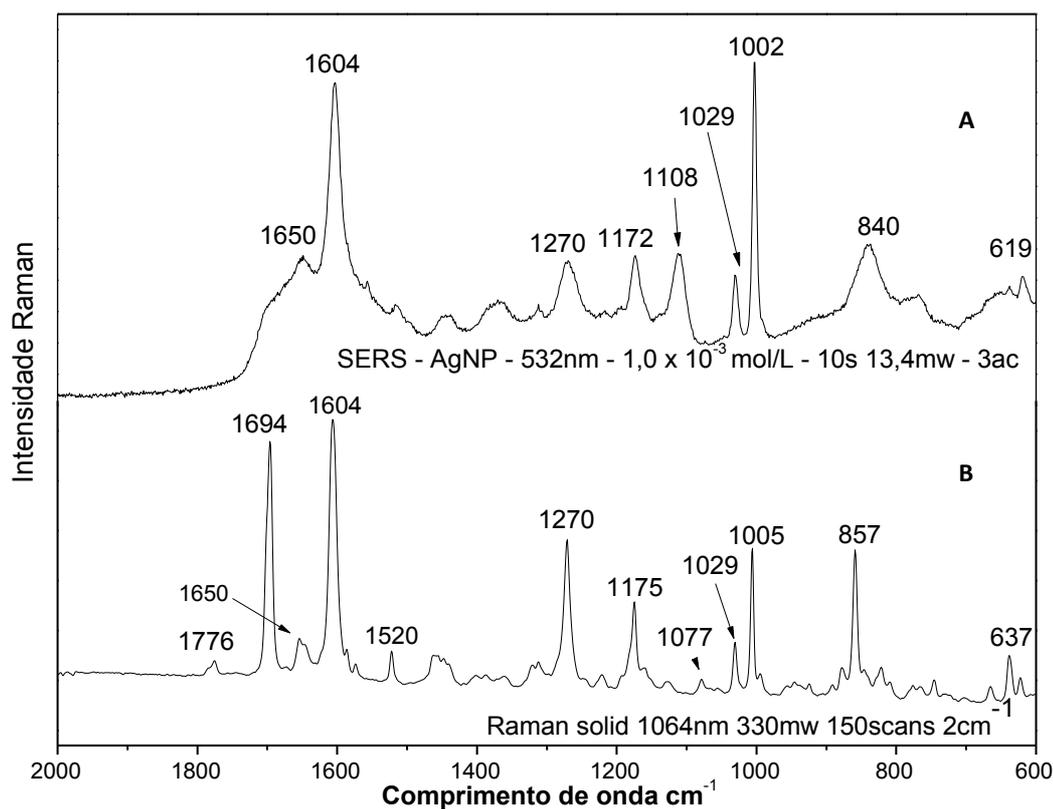
Fonte: Próprio autor

Através das diferenças observadas para o espectro Raman do sólido e o espectro SERS AM com AgNP, pode se inferir que a ligação do ATB com a AgNP ocorre através da carboxila do grupamento amida, o que pode ser inferido pela intensificação do sinal das bandas em  $1661\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{CO})$  amida,  $1514\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{CN})$  amida +  $\delta(\text{NH})$ . A intensificação das bandas atribuídas aos modos fora do plano do anel  $\beta$ - lactâmico sugerem que este anel está paralelo à superfície metálica.

#### 4.8.2 Benzilpenicilina (BP=PG + procaína)

A fórmula estrutural do PG está ilustrada na figura 13 (b) e espectros SERS e Raman sólido estão mostrados abaixo, nas figuras 35, 36 e 37 respectivamente. Como já mencionado a PG analisada está associada com o analgésico procaína.

Figura 35: A) Espectro SERS da BP  $3.70^{-3}$  mol/L e B) Espectro Raman da BP sólida.



Fonte: Próprio autor

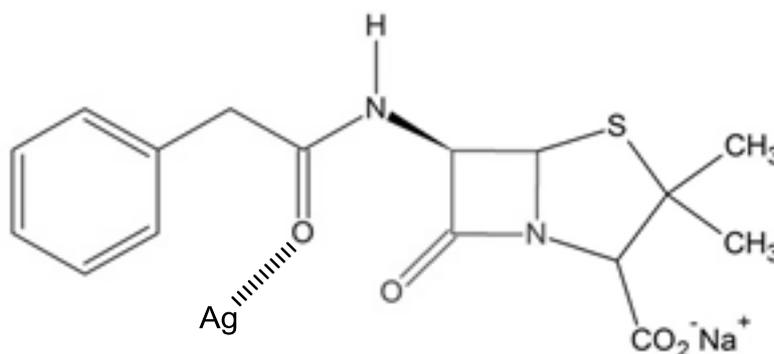
Na tabela 14 estão apresentadas as atribuições vibracionais do BP para o espectro Raman e SERS, assim como referencial bibliográfico.

Tabela 14: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da BP (valores em  $\text{cm}^{-1}$ )

Experimento		Literatura (FILGUEIRAS, 2013)		Tentativa de atribuição
SERS 532 nm	Raman sólido 1064 nm	SERS – 532 nm	Raman sólido 1064 nm	
-	1776	-	1763	$\nu$ (CO) $\beta$ - lact.
-	1694	1685	1750	$\nu$ (CO)ác. carb.
1650sh	1650	-	1661	$\nu$ (CO)amida + $\delta$ (NH)
1604	1604	-	1608	$\nu$ (CC)fe
-	1270	-	-	$\nu$ (CN)amida/ $\nu$
-	1175	-	-	$\delta$ (CC)fe + $\delta$ (CH)fe Procaina
1029	1029	1032	1035	$\nu$ (CC)fe
1002	1005	-	1004	Respiração fenil
840	857	-	-	$\delta$ (COO)+ $\delta$ (CCC) Procaina

$\nu$  = estiramento;  $\delta$  = variação de ângulo; fe = fenil; Sh= ombro.

Figura 36: Geometria de adsorção da BP

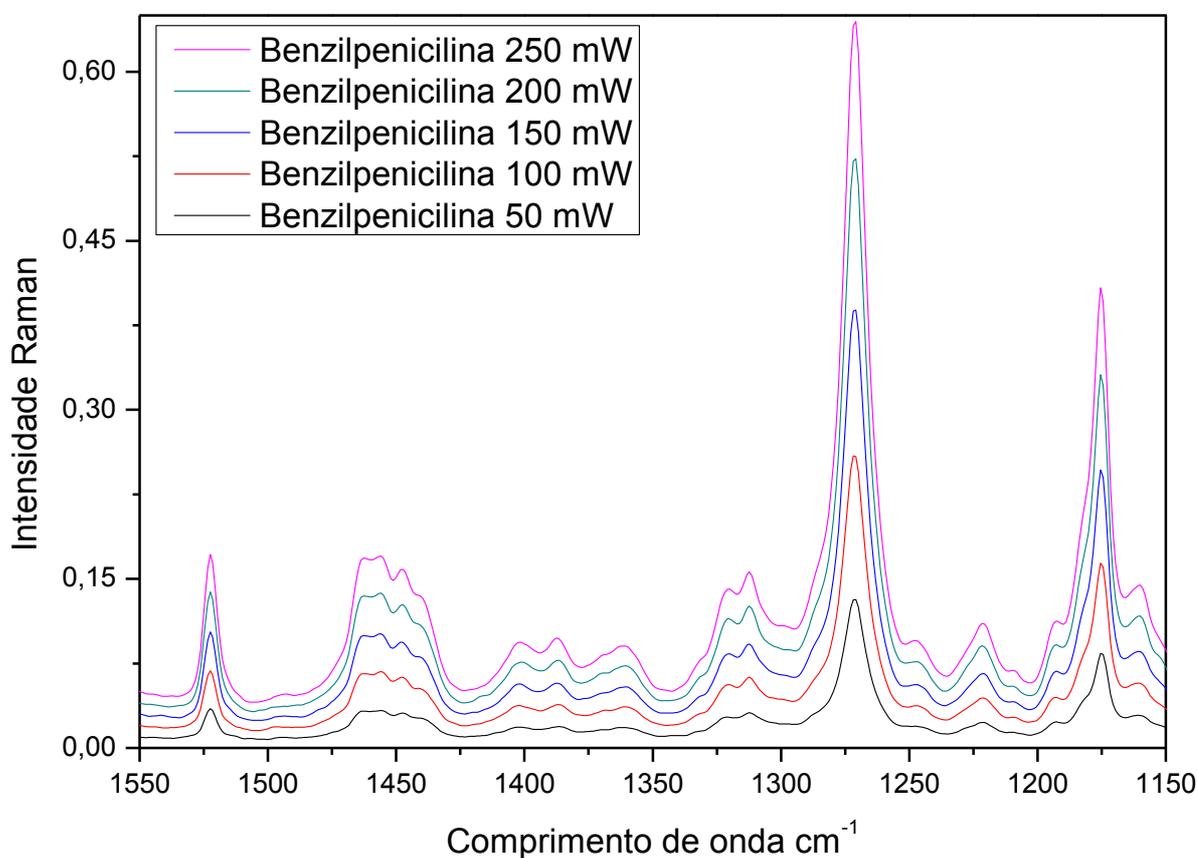


Fonte: Próprio autor

A Figura 35 e a tabela 14 apresentam o espectro Raman da BP sólida e SERS da BP obtido utilizando  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ . As diferenças nos números de onda dos espectros teórico e experimental são uma consequência da anarmonicidade não ser considerada nos cálculos DFT. As bandas Raman em 1604, 1029 e 1005  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento  $\nu$ (CC)fe são as mais intensas no espectro Raman, sendo isto devido à alta polarizabilidade do anel fenílico. A banda Raman em 1776  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao  $\nu$  (CO) $\beta$ - lact. do ácido carboxílico mostra que no estado sólido a espécie predominante é a PG protonada. Através da atribuição realizada por Filgueiras (2013), as bandas no espectro SERS em 1650 e 1604  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao  $\nu$

(CO)amida +  $\delta$ (NH) e  $\nu$ (CC)fe, permite inferir que a adsorção ocorre pela amida com anel fenílico perpendicular à superfície. Na tese de Filgueiras (2013) a autora indica que a PG está protonada no estado sólido, mas desprotonada quando adsorvida, no entanto a presença da banda em  $1694\text{ cm}^{-1}$  no espectro do sólido é atribuída a carbonila do ácido carboxílico, pode ser observado como ombro em  $1690\text{ cm}^{-1}$  no espectro SERS, permitindo supor que a molécula está protonada quando coadsorvida com a procaína. A ausência da banda SERS, atribuída ao  $\nu$  (CO) $\beta$ - lact. do ácido carboxílico indica que tal grupo não está interagindo com a superfície metálica.

Figura 37: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.

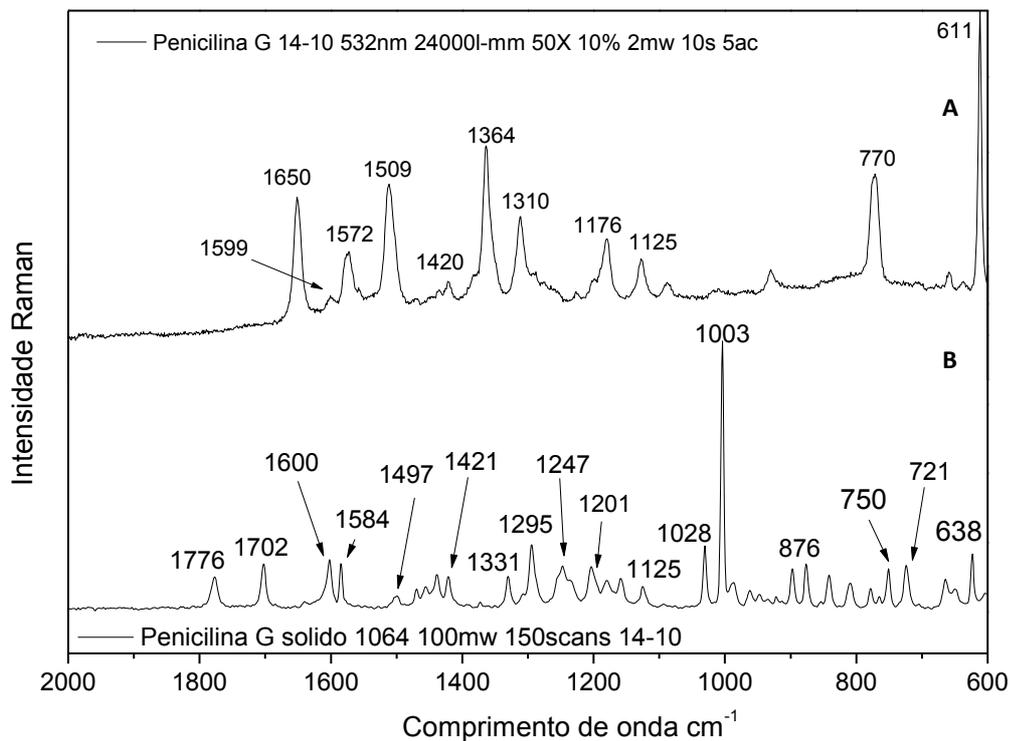


Fonte: Próprio autor

### 4.8.3 Penicilina G (PG)

A fórmula estrutural do PG está ilustrada na figura 13 (b), única diferença frente a amostra anterior é que na amostra chamada de BP existe o analgésico procaína associado. Os espectros SERS e Raman sólido estão demonstrados abaixo, nas figuras 38 e 39 respectivamente.

Figura 38: A) Espectro SERS da PG  $3.10^{-3}$  mol/L e B) Espectro Raman da PG sólida.



Fonte: próprio autor

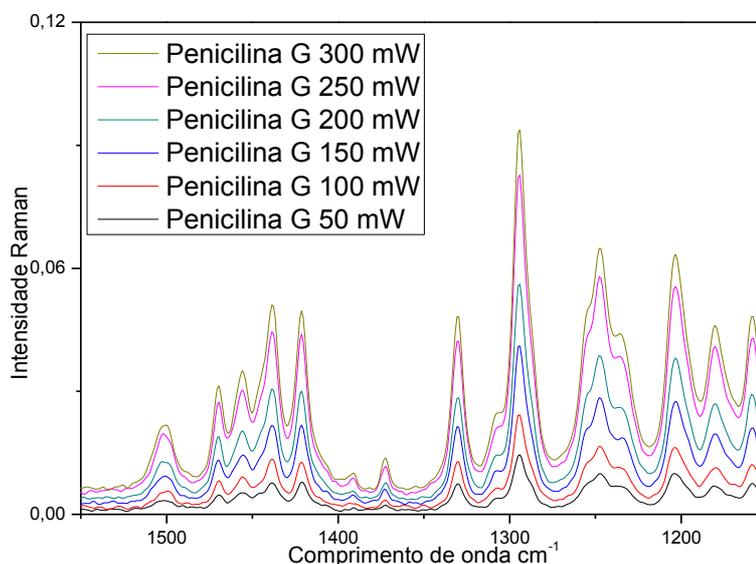
Na tabela 15 estão apresentadas as atribuições vibracionais do PG para o espectro Raman e SERS, assim como referencial bibliográfico.

Tabela 15: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da PG (valores em  $\text{cm}^{-1}$ )

Experimento		Raman Calculado/ $\text{cm}^{-1}$	Tentativa de atribuição
SERS – 532nm	Raman sólido 1064 nm		
-	1776	1856	$\nu$ (CO) $\beta$ - lact.
-	1702	1832	$\nu$ (CO) $\acute{\alpha}$ c. carb.
1650	-	1693	$\nu$ (CO)amida + $\delta$ (NH)
1599	1600	1648	$\nu$ (CC)fe
1572	1584	1626	$\nu$ (CC)fe
1509	-	1558	$\nu$ (CN)amida + $\delta$ (NH)
1364	1331	1464	$\nu$ (C-COO $^-$ )
1310	1295	-	$\nu$ (CN)amida
-	1003	1004	Respiração fenil
770	750/721	805	$\tau$ (CNCO)lactam-fp
611	638	704	$\tau$ (CNCO)lactam-fp

$\nu$  - estiramento;  $\delta$  - deformação angular; fe – fenil;  $\tau$  – torção; fp fora do plano.

Figura 39: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.



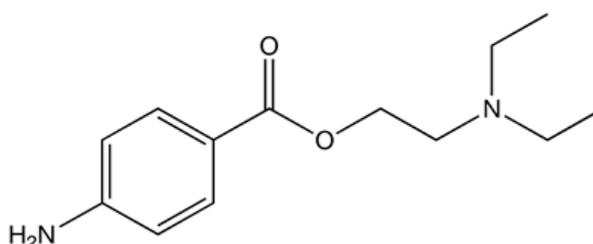
Fonte: próprio autor

As mesmas atribuições inferidas para a BP podem ser atribuídas aos espectros da PG, porém as bandas atribuídas à procaína estão ausentes. A banda SERS observada em  $1364\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao  $\nu(\text{C-COO}^-)$  que também foi observada no espectro SERS da AM em  $1365\text{ cm}^{-1}$  está ausente no espectro SERS da BP, indicando a possível adsorção da PG protonada na presença de procaína e desprotonada na ausência dessa. Isso indica que é possível a interação da PG com procaína por ligação de hidrogênio envolvendo o ácido carboxílico. A intensificação das bandas atribuídas aos modos fora do plano do anel  $\beta$ -lactâmico sugerem que este anel está paralelo à superfície metálica.

#### 4.8.4 Diferenciação Raman – Penicilina G Vs Benzipenicilina procaína

Na figura 40 esta demonstrada a fórmula estrutural da procaína, através da mesma é possível inferir que há grupamentos que favorecem interações por ligação de hidrogênio com a molécula de PG.

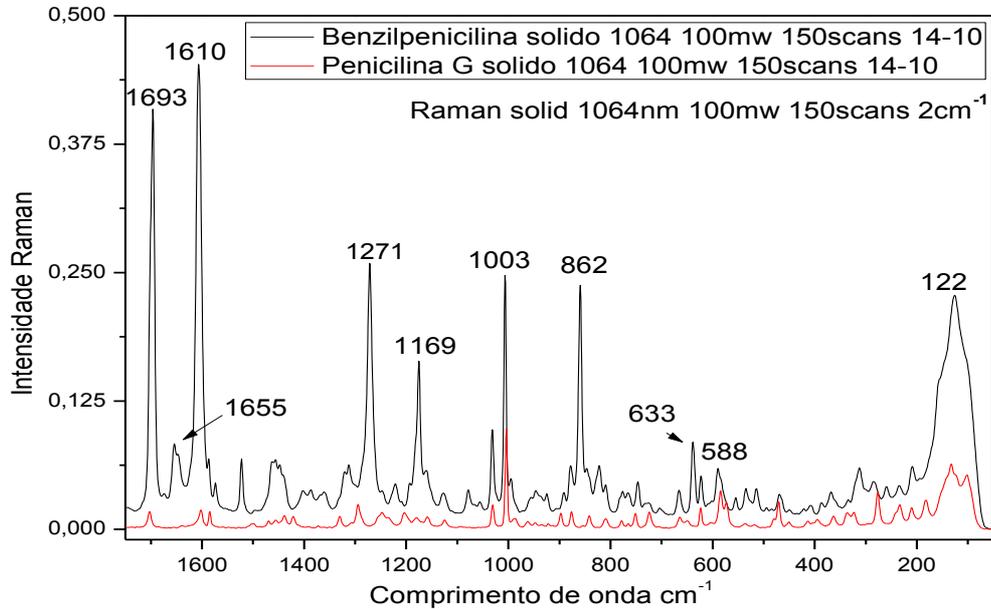
Figura 40: Fórmula estrutural da Procaína.



Fonte: Próprio autor

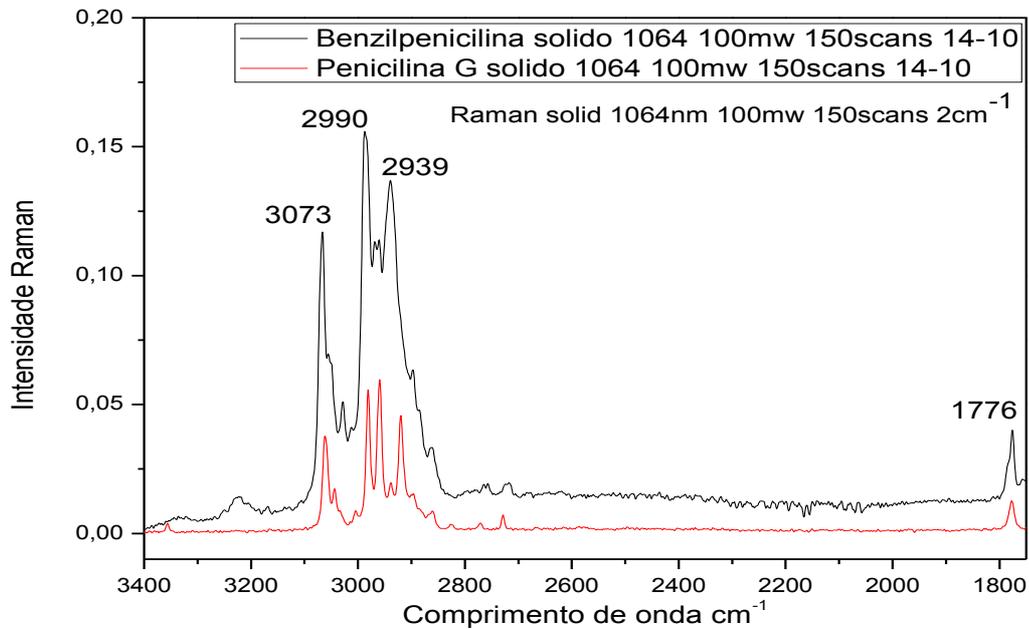
Os espectros Raman e SERS da PG e da BP estão apresentados abaixo, nas figuras 41, 42 e 43, para facilitar a comparação apresentada nos espectros anteriores.

Figura 41: Espectro Raman do sólido PG Vs BP ( $150$  a  $1750$   $\text{cm}^{-1}$ ).



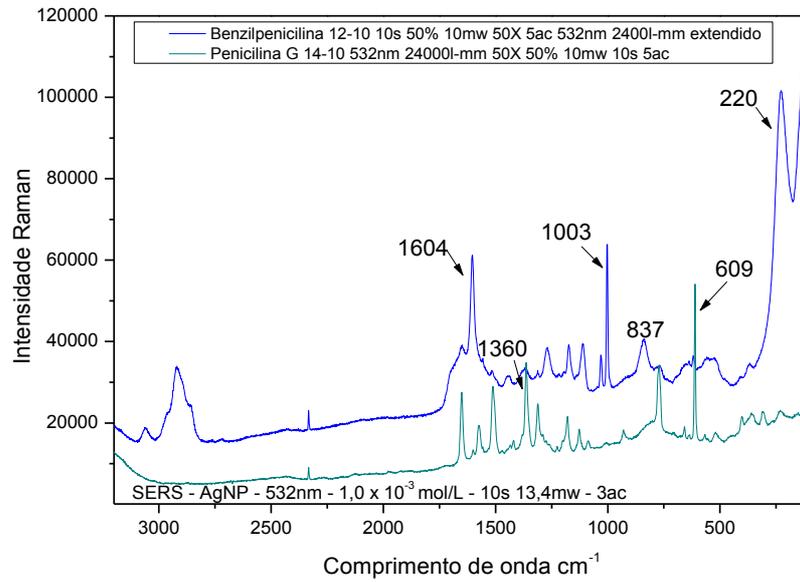
Fonte: próprio autor

Figura 42: Espectro Raman do sólido PG Vs BP ( $1750$  a  $3400$   $\text{cm}^{-1}$ ).



Fonte: próprio autor

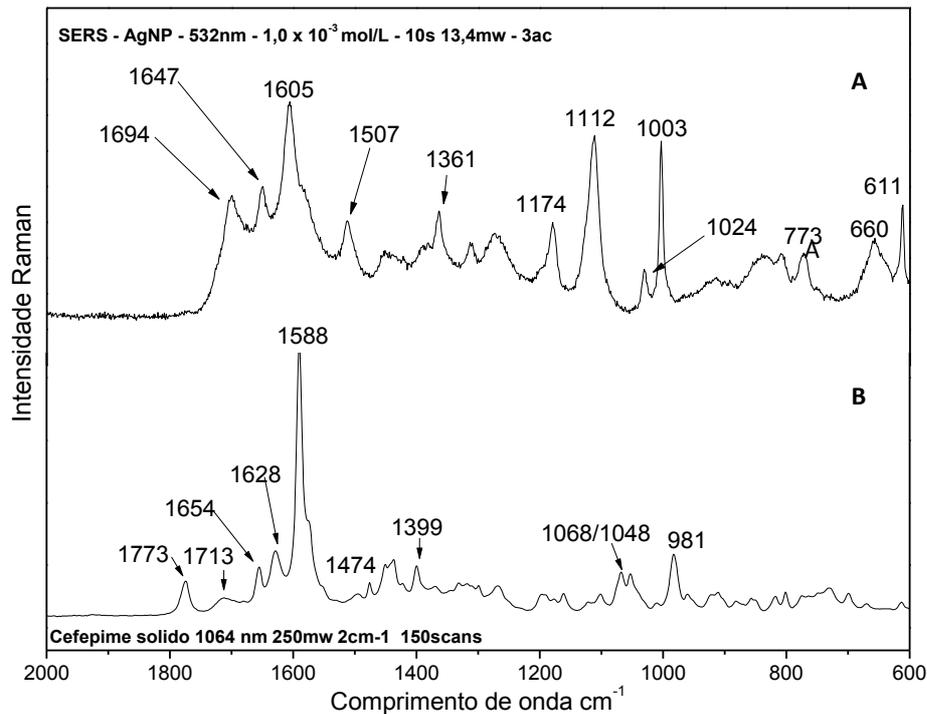
Figura 43: Espectro SERS da PG Vs BP.



Fonte: próprio autor

#### 4.8.5 Cefepime (CE)

A fórmula estrutural do CE esta ilustrada na figura 18 e espectros SERS e Raman sólido estão demonstrados abaixo, nas figuras 44, 45 e 46 respectivamente.

Figura 44: A) Espectro SERS da CE  $1.10^{-2}$  mol/L e B) Espectro Raman da CE sólida.

Fonte: Próprio autor

Na tabela 16 estão apresentadas as atribuições vibracionais do CE para o espectro Raman e SERS, assim como referencial bibliográfico.

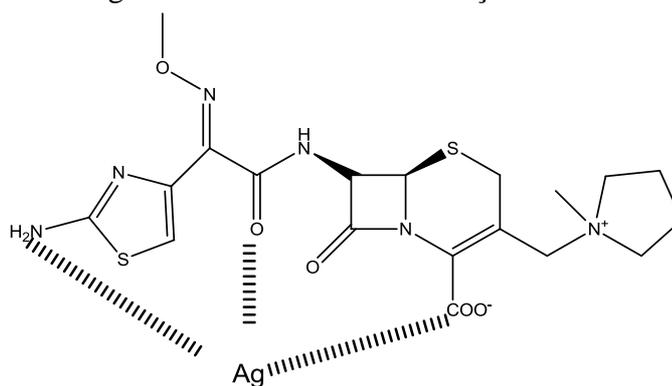
Tabela 16: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman do CE (valores em  $\text{cm}^{-1}$ )

Experimento		Literatura (FILGUEIRAS, 2013)			Literatura (BARALDI et al., 2014)		Tentativa de atribuição
		Molécula analisada BP			AM		
SERS – 532nm	Raman sólido 1064 nm	Raman sólido 1064 nm	Raman Calculado	SERS – 532 nm	Raman sólido 632,8 nm		
-	1773	1763(sh)	1856	-	-		$\nu(\text{CO})\beta\text{-Lactâmico}$
1694	1713	-	-	1655	-		$\nu(\text{CO})$ ác.carb
1647	1654	1661	1746	1684	-		$\nu(\text{CO})$ amida
-	1628	-	-	-	-		$\nu(\text{CC})+\nu(\text{CN})$
1605	1588	1585	1568	1584	1604		$\nu(\text{CC})+\nu(\text{CN})$
660	-	-	-	-	-		$\nu(\text{CS})$ anel tiazólico

$\nu$  = estiramento; sh = ombro.

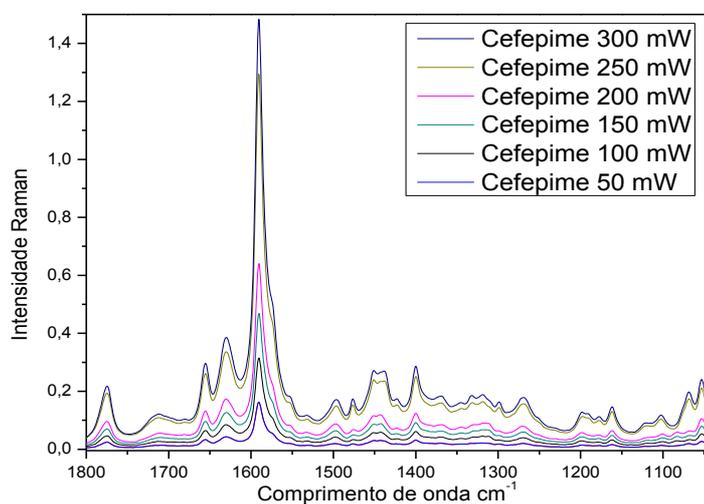
Na tabela 16 estão apresentadas as atribuições vibracionais do CE para o espectro Raman e SERS, assim como referencial bibliográfico, foi utilizado espectros de duas moléculas similares, por esse ser uma cefalosporina, um ATB da classe dos  $\beta$  – lactâmicos, utilizou-se as atribuições descritas na literatura para a AM e PG. Pode-se inferir que através da intensificação do sinal no espectro SERS da banda em  $1605 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao  $\nu(\text{CN})$  e das bandas em  $1647$  e  $1694 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas aos  $\nu(\text{CO})$  da amida e do ácido carboxílico, respectivamente, permitem inferir que a interação da AgNP com a molécula ocorre através da aproximação dos grupos, tiazol, amida e o ácido carboxílico. A intensificação da banda em  $660 \text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao  $\nu(\text{CS})$  do anel tiazólico, que reforça a hipótese anterior.

Figura 45: Geometria de adsorção do CE



Fonte: Próprio autor

Figura 46: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.

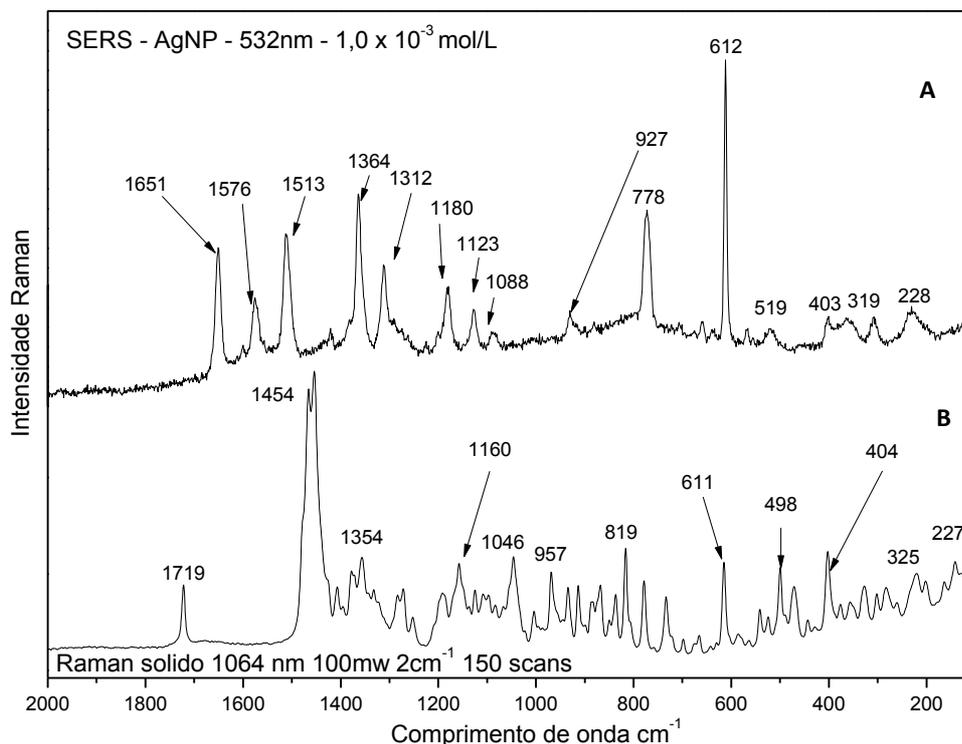


Fonte: Próprio autor

#### 4.8.6 Azitromicina (AZ)

A fórmula estrutural da AZ está ilustrada na figura 16 e espectros SERS e Raman sólido estão demonstrados abaixo, nas figuras 47, 48 e 49 respectivamente.

Figura 47: A) Espectro SERS do AZ  $1.10^{-2}$  mol/L e B) Espectro Raman do AZ sólida.



Fonte: próprio autor

Na tabela 17 estão apresentadas as atribuições vibracionais do AZ para o espectro Raman e SERS, assim como referencial bibliográfico.

Tabela 17: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman do AZ (valores em  $\text{cm}^{-1}$ )

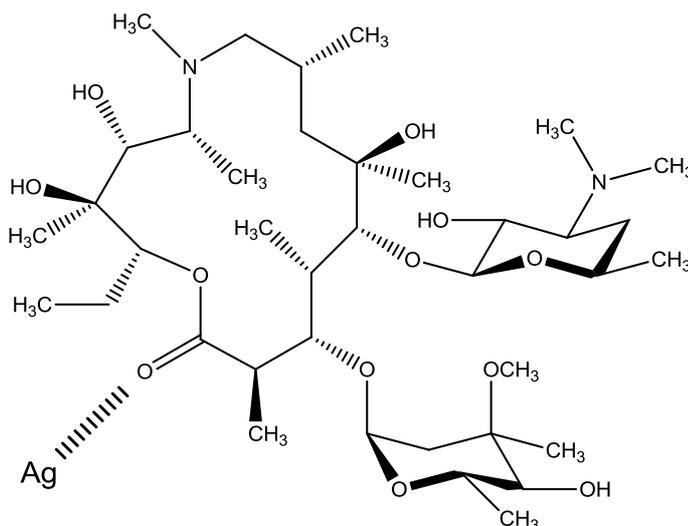
Experimentos		Literatura (SHENDE et al., 2014)	Tentativa de atribuição
Raman sólido – 1064 nm	SERS – 532nm	Raman sólido – 1064 nm	
1719	1651	-	$\nu_s(\text{CO})$
-	1576	-	-
1454	1513	1454	$\nu(\text{COC} + \text{CC} + \text{CNC})$
1354	1364	-	$\nu(\text{CC} + \text{CN})$ lactona
1160	1180	1200	$\delta(\text{CH} + \text{CH}_2)$
1046	1088	1170	$\delta(\text{CH} + \text{OH})$
819	778	814	$\delta(\text{HCCH})$ anel lactona
611	612	600	$\delta(\text{CCH}_2 + \text{CCH}_3)$

$\nu$  = estiramento;  $\delta$  = variação de ângulo;

AZ tem numerosos grupos metil, o espectro Raman do sólido é dominado por um pico em  $1454 \text{ cm}^{-1}$  devido ao modo de estiramento de éter, enquanto os estiramentos CC e CNC, e modos de flexão CH aparecem entre  $611, 1046$  e  $1160 \text{ cm}^{-1}$  (SHENDE et al., 2014). Dentro

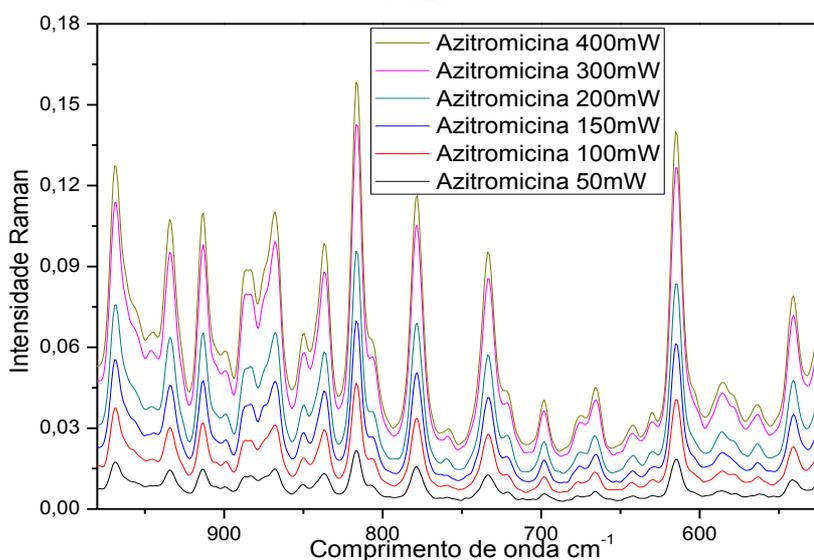
desta região ocorrem pequenas mudanças; em particular, o pico em  $819\text{ cm}^{-1}$  perde a intensidade e muda para  $778\text{ cm}^{-1}$ . A maior diferença espectral entre o Raman do sólido e do SERS envolve o deslocamento da banda atribuída ao  $\nu(\text{CO})$  da carbonila do anel lactona, que leva a inferir que ligação ocorre pela coordenação da carbonila com a superfície metálica, pois o mesmo não é mais verificado no SERS.

Figura 48: Geometria de adsorção da AZ



Fonte: Próprio autor

Figura 49: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.

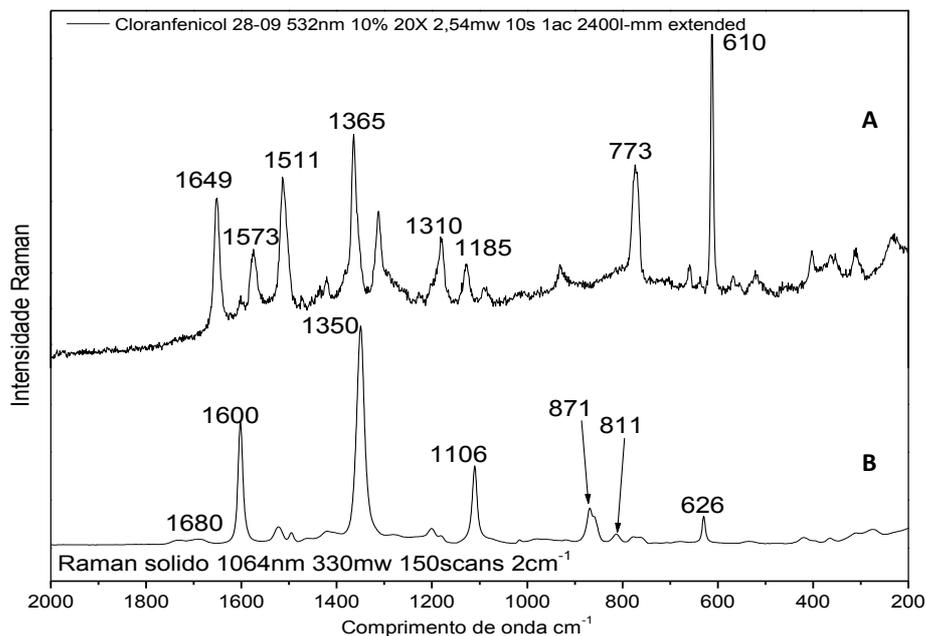


Fonte: Próprio autor

#### 4.8.7 Cloranfenicol (CL)

A fórmula estrutural do CL está ilustrada na figura 17 e espectros SERS e Raman sólido estão demonstrados abaixo, nas figuras 50, 51 e 52 respectivamente.

Figura 50: A) Espectro SERS da CL  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L e B) Espectro Raman da CL sólida.



Fonte: Próprio autor

Na tabela 18 estão apresentadas as atribuições vibracionais do CL para o espectro Raman e SERS, assim como referencial bibliográfico.

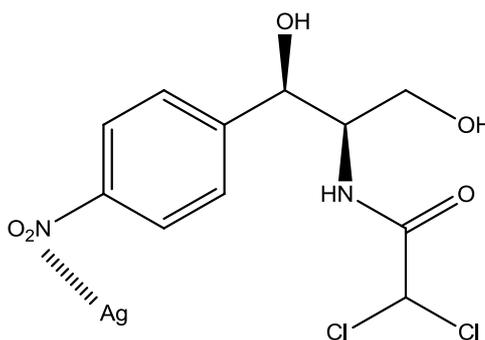
Tabela 18: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman do CL (valores em  $\text{cm}^{-1}$ )

Experimental		Tentativa de atribuição
SERS -532 nm	Raman sólido 1064	
1649	1680sh	$\nu(\text{CO}) + \delta(\text{NH})$ amida
-	1600	$\nu(\text{CC})$ fe
1573	-	$\nu(\text{CC})$ fe
1511	-	$\nu(\text{NO}_2)$ as
1365	1350	$\nu(\text{NO}_2)$ s
773	871	$\delta(\text{C-Cl}_2)$ $\nu$
658	811	$\nu(\text{N-O})$
610	626	$\nu(\text{NH} + \text{CO})$

$\nu$  = estiramento;  $\delta$  = variação de ângulo; sh = ombro; fe – fenil; as=antissimétrico; s=simétrico.

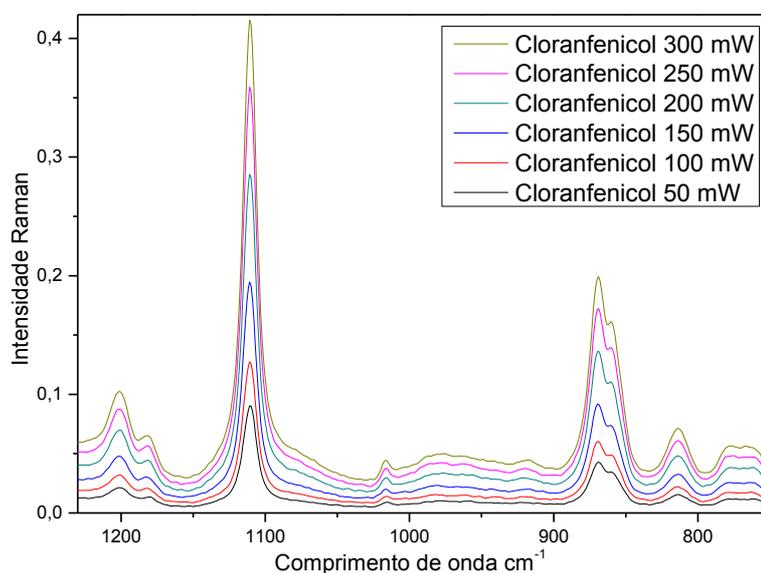
O espectro Raman do sólido é dominado por um pico em  $1350\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao  $\nu(\text{NO}_2)$ s. Apesar de no espectro SERS as bandas em  $1365$  e  $1511\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas ao grupamento nitro estarem intensificadas, as bandas referentes ao grupamentos carbonila e aos átomos de cloro também estão muito intensas, indicando que estes grupos estão próximos à superfície. Dessa maneira o CL tem numerosos grupos que podem servir como sítios de adsorção do ATB na AgNP.

Figura 51: Geometria de adsorção do CL



Fonte: Próprio autor

Figura 52: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.

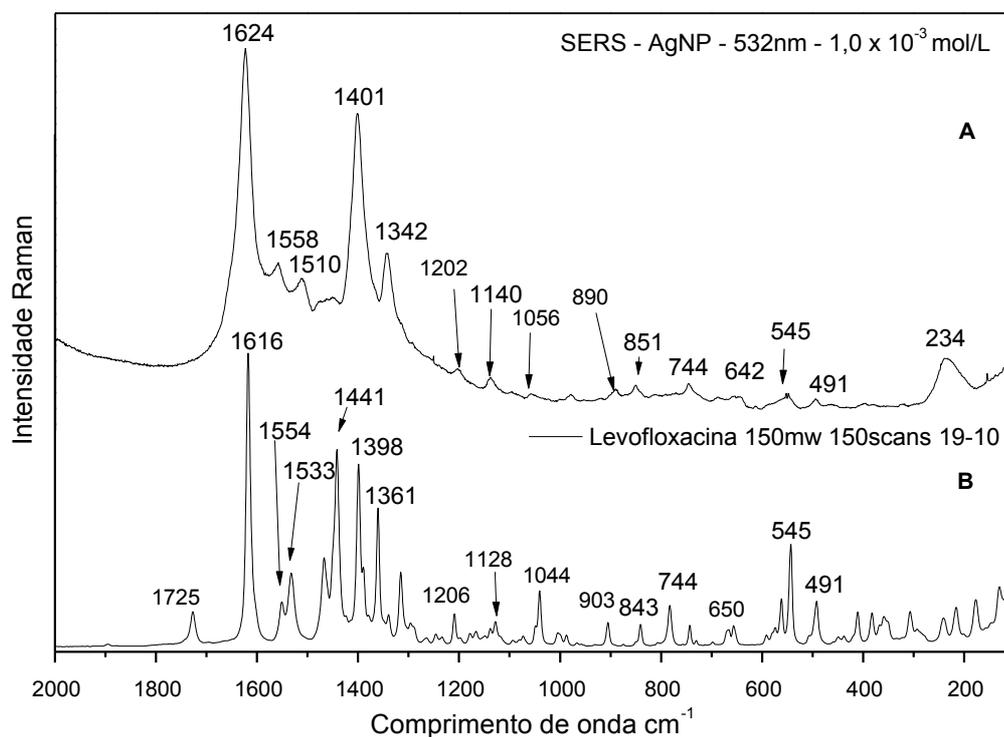


Fonte: Próprio autor

#### 4.8.8 Levofloxacin (LV)

A fórmula estrutural do LV está ilustrada na figura 14, Os espectros SERS e Raman sólido da LV estão demonstrados abaixo, nas figuras 53, 54 e 55 respectivamente.

Figura 53: A) Espectro SERS da LV  $1.10^{-2}$  mol/L. B) Espectro Raman sólido.



Fonte: próprio autor

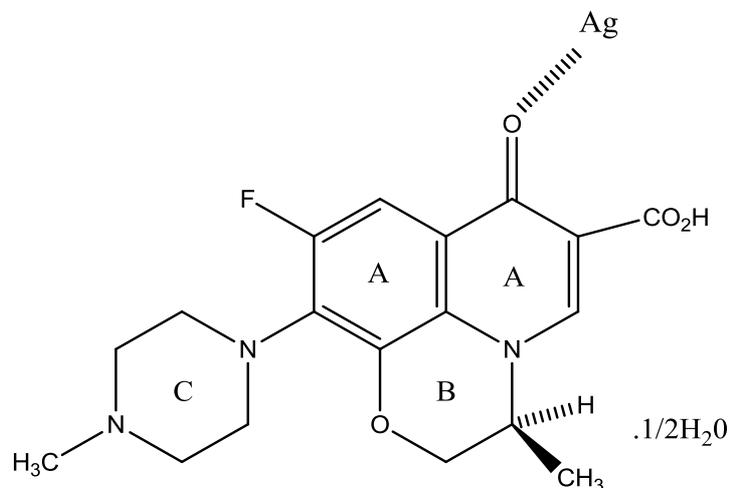
Na tabela 19 estão apresentadas as atribuições vibracionais da LV para o espectro Raman e SERS, assim como referencial bibliográfico.

Tabela 19: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman da LV (valores em  $\text{cm}^{-1}$ )

Experimentos		Literatura (FILGUEIRAS, 2013)	Tentativa de atribuição
Raman sólido 1064 nm	SERS 532 nm	SERS Levo 1064 nm	
1725	-	-	$\nu(\text{CO})$
1616	1624	1622	$\nu(\text{CC} + \text{CN})$
1554	1558	1556	$\nu(\text{COO}^-)$
1533	1510	-	$\delta(\text{CH}_2\text{CH}_3)$
1441	-	1454	$\delta(\text{CH}_2\text{CH}_3)$
1398	1401	1401	$\nu(\text{CC} + \text{CN})$
1361	-	-	$\nu(\text{CC})$
-	1342	1341	$\nu(\text{CC})$

$\nu$  = estiramento;  $\delta$  = variação de ângulo;

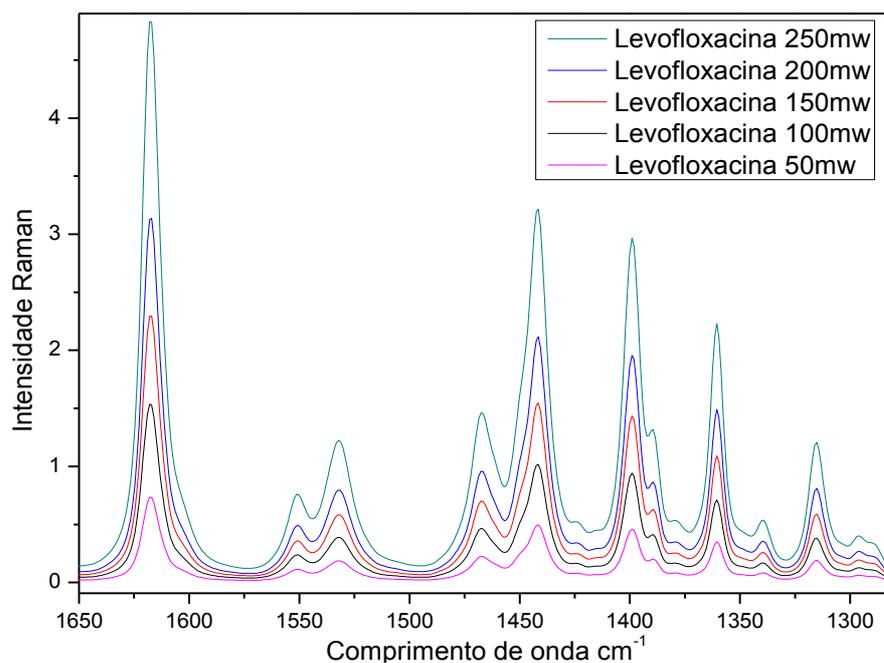
Figura 54: Geometria de adsorção da LV



Fonte: Próprio autor

As bandas 1624, 1558, 1401 e 1342  $\text{cm}^{-1}$  intensificadas no espectro SERS são atribuídas aos  $\nu(\text{CC} + \text{CN})$ ,  $\nu(\text{COO}^-)$  e  $\nu(\text{CC})$ , respectivamente, envolvendo ligações presentes nos anéis aromáticos da molécula. Isto indica que a superfície da prata está interagindo pelos grupamentos carbonila, com os anéis aromáticos perpendiculares à superfície, de acordo com a regra de seleção de superfície.

Figura 55: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.

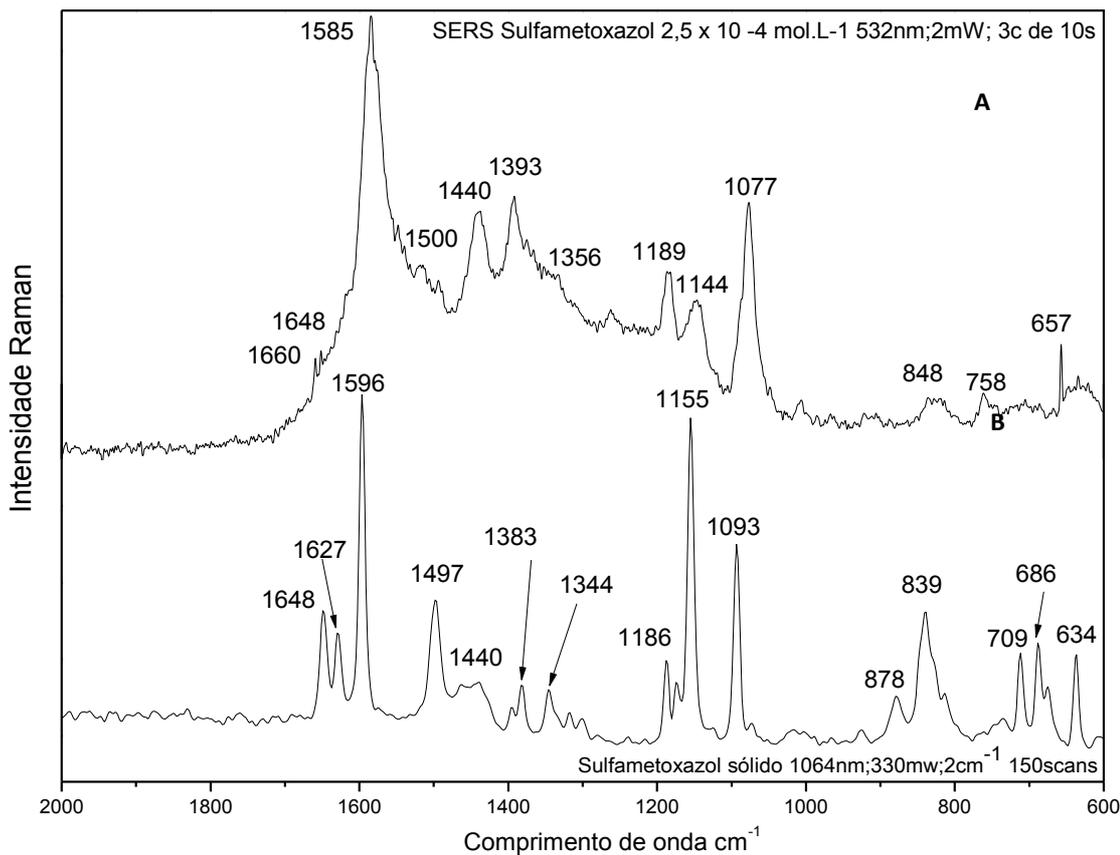


Fonte: próprio autor.

#### 4.8.9 Sulfametoxazol (SF)

A fórmula estrutural do SF está ilustrado na figura 19, os espectros Raman do sólido e SERS do SF adsorvida nas AgNPs são apresentados nas figuras 56, 57 e 58 respectivamente.

Figura 56: A) Espectro SERS da SF  $1.10^{-3}$  mol/L e B) Espectro Raman da SF sólido.



Fonte: próprio autor

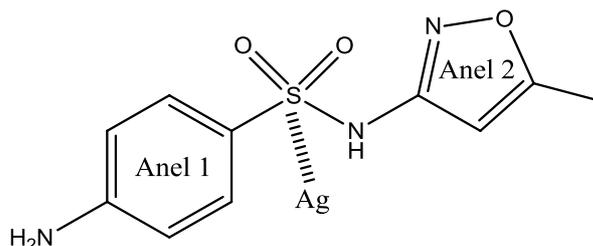
Na tabela 20 estão apresentadas as atribuições vibracionais da SF para o espectro Raman e SERS, assim como referencial bibliográfico.

Tabela 20: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman do SF (valores em  $\text{cm}^{-1}$ )

Experimento		Experimental (UNGUREAN et al., 2014)		Tentativa de atribuição
SERS 633 nm	Raman normal 1064 nm	SERS 532 nm	Raman normal 1064nm	
1648sh	1648	1629	1636	$\delta$ ( $\text{NH}_2$ )
-	1627	-	1616	$\delta$ ( $\text{NH}_2$ )
1585	1596	1589	1591	$\nu$ (CC),anel 1 + $\delta$ ( $\text{NH}_2$ )
1500	1497	1526	1508	$\nu$ (CC)anel 1 + $\nu$ (C - $\text{NH}_2$ )
1440	1440sh	1455	1465	-
1393	1383	-	1416	$\nu$ (CC) anel 2 + $\nu$ (CN)anel 2
1144	1155	-	1155	$\nu$ ( $\text{SO}_2$ ) s + $\nu$ (C- $\text{SO}_2$ )
1077	1093	1076	1091	$\nu$ ( $\text{SO}_2$ ) s + $\nu$ (C- $\text{SO}_2$ )
-	686	-	687	$\delta$ (CC,CN) fp anel 2 + (CC)fp anel 1

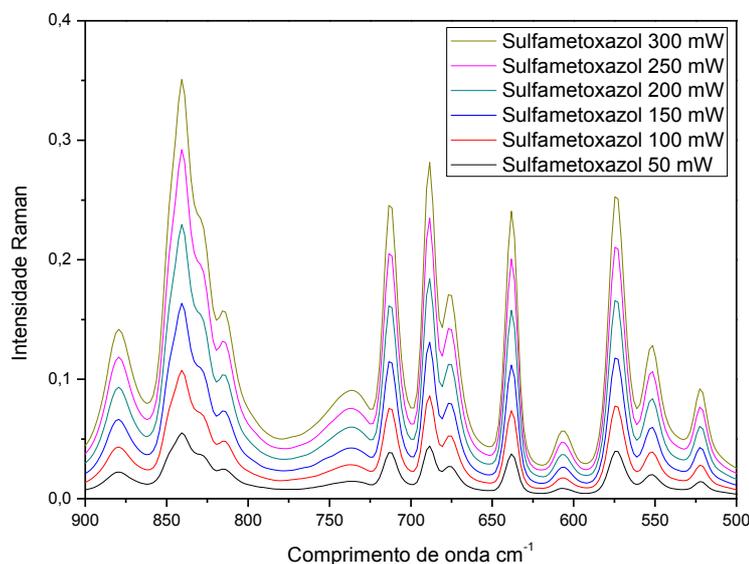
$\nu$  = estiramento;  $\delta$  = variação de ângulo; sh = ombro. fp= fora do plano; s = simétrico

Figura 57: Geometria de adsorção do SF



Fonte: Próprio autor

Figura 58: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.



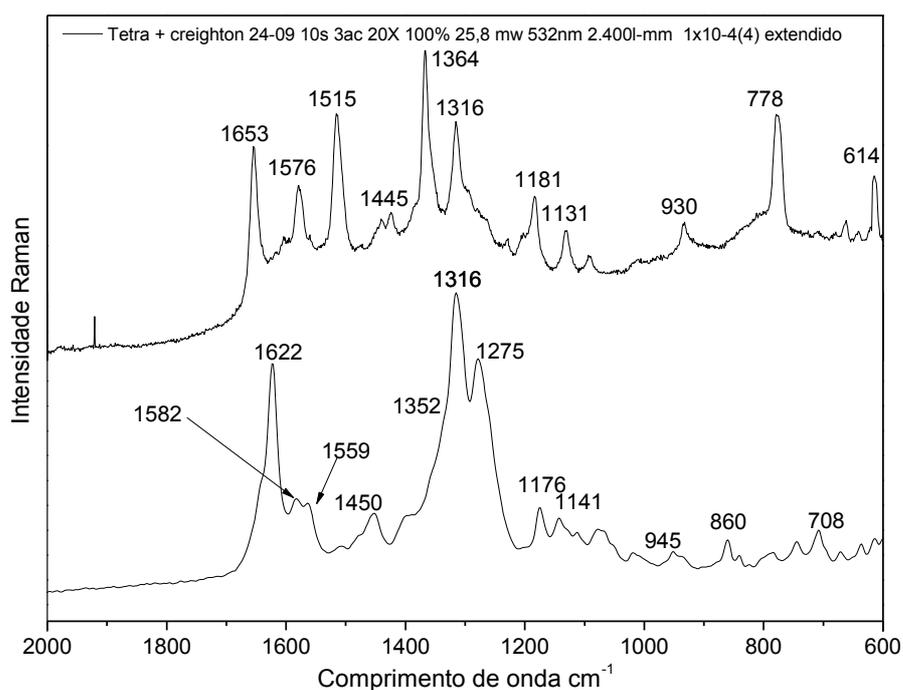
Fonte: próprio autor

No espectro SERS do SF as bandas intensas em 1144 e 1077  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento do grupo sulfonila indicando que este deve ser o sítio de ancoramento da molécula na superfície da AgNP. Estando em concordância com os cálculos e valores experimentais da referência utilizada (UNGUREAN et al., 2014).

#### 4.8.10 Tetraciclina (TC)

A fórmula estrutural da TC esta demonstrada na figura 15, os espectros Raman do sólido e SERS da TC adsorvida nas AgNPs são apresentados nas figuras 59, 60 e 61 respectivamente.

Figura 59: A) SERS da TC  $1.10^{-3}$  mol/L. B) Espectro Raman TC sólido.



Fonte: próprio autor

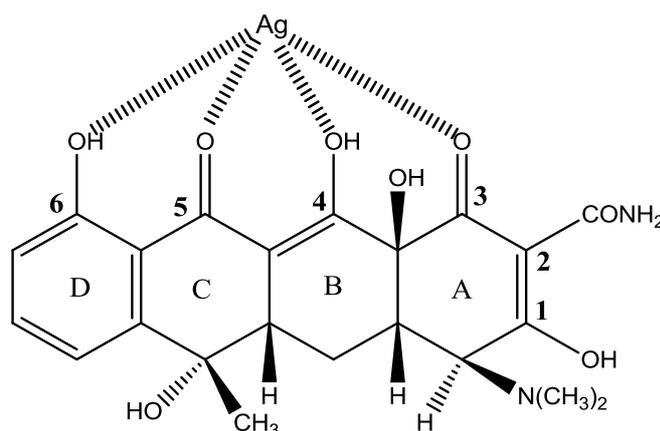
As atribuições para o espectro Raman e SERS da TC estão resumidas na tabela 21.

Tabela 21: Atribuições vibracionais do espectro SERS e Raman do TC (valores em  $\text{cm}^{-1}$ )

Experimento		Literatura (FILGUEIRAS, 2013)		Tentativa de atribuição
SERS 532 nm	Raman normal 1064nm	SERS / 532nm	Raman normal 1064nm	
1653	1622	1612	1624	$\nu(\text{CO})_{\text{amida}} + \nu(\text{C}_1\text{-O})$
1576	1559	1563	1564	$\nu(\text{C}_5\text{O})$
1515	-	1515	-	$\delta(\text{CH}_2) + \delta(\text{OH})$
1364	1352sh	1335	1345	$\nu(\text{C}_6\text{O})$
1316	1316	1310	1317	$\nu(\text{CC})$ anéis AB + $\nu(\text{C}_6\text{O})$
-	1275	-	1292	$\delta(\text{CH}_2)$

$\nu$  = estiramento;  $\delta$  = variação de ângulo; sh = ombro.

Figura 60: Geometria de adsorção da TC



Fonte: Próprio autor

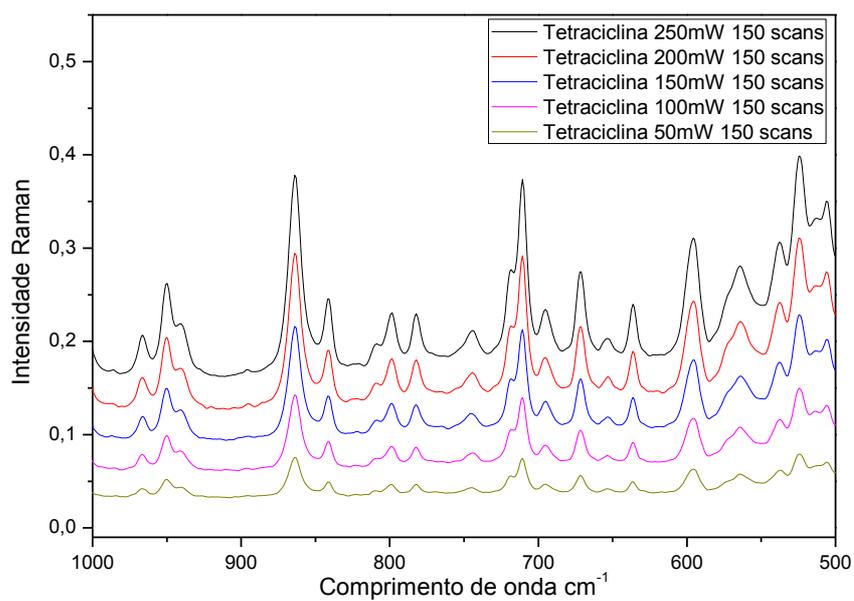
As letras A, B, C, D e os números 1,2,3,4,5,6 presentes na tabela 21 que correspondem as atribuições vibracionais da TC estão simbolizadas na figura 15.

A intensificação das bandas no espectro SERS da TC (figura 59 A) sugere que a molécula se coordena preferencialmente pelos grupos hidroxila, carbonila e amida na superfície da prata, o que permite concluir que o plano dos anéis B, C e D da molécula encontram-se aproximadamente perpendiculares à superfície da prata, adsorvida pelos oxigênios laterais.

O mecanismo de ação proposto na literatura indica atividades diferentes das AgNPs e do TC. As AgNPs interagem principalmente na parede celular da bactéria, criando poros, com isso facilitando a entrada da TC na célula bacteriana (MAILLARD; HARTEMANN,

2012). A atividade antibacteriana da TC esta relacionada aos grupamentos amina junto da hidroxila e metila do anel (LEYPOLD, 2003) que não estão comprometidos com a adsorção na superfície da AgNP, conforme proposta descrita. Corroborando com o efeito sinérgico no ensaio do *Checkerboard*.

Figura 61: Espectro Raman do sólido em função da potência do laser, realizados com 150 scans.



Fonte: próprio autor

## 5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que, através dos resultados obtidos pelas análises e testes realizados, que a associação de QBPM, com pH ajustado em 6,0, proporção molar  $\text{BH}_4^-:\text{Ag}$  em 6:1, com a síntese em temperatura ambiente e banho ultrassônico na síntese do Col G, levou a uma composição que apresentou menor valor de CIM, frente as linhagens de bactérias analisadas, quando comparado para o CIM de cada componente isolado. Foi possível também inferir que para a maiorias dos artigos que não avaliam o efeito do pH do coloide ou da própria solução de QT, os resultados podem ser questionados.

Através das análises de *Checkerboard* foi possível assumir que os ATBs AZ, LV, TC apresentaram resultado sinérgico quando associado ao Col G para tratamento de cepas Gram negativas, visto que o resultado do CIF para as associações ficaram abaixo de 0,5 para os três ATBs testados. Para cepas Gram positivas verificou-se valores sinérgicos para associação de AZ e TC, para LV o valor foi aditivo.

O Valor de CIM da associação foi muito favorável quando comparado ao efeito de ambos as substancias testadas de forma isolada. As AgNPs servirão então como um possível transportador dos ATBs, possuindo potencial para agir contra a resistência dos microrganismos.

A espectroscopia SERS é uma ferramenta importante para os estudos dos sítios de interação dos antibióticos com a superfície da AgNP, bem como na avaliação da atividade transportadora das AgNPs no meio biológico. Os ATB's mostraram possuir sítios para adsorção sobre a superfície da AgNP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, S.L. **Caracterização e dispersão em meio aquoso da  $\alpha$ -Alumina com tamanho de partícula submicrométrico e nanométrico**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2011.
- ADAMSON, A.W. **Physical chemistry of surfaces**.6.ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.784p.
- ADO, Jorio et al. **raman spectroscopy in graphene related systems**. Redwood City,: John Wiley, 2011. 368 p.
- ANDO, Rômulo Augusto. **Espectroscopia Vibracional, Raman Ressonante e Eletrônica de Nitroderivados em Sistema Conjugados**. 2005. 144 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ANDREOU, Chrysafis et al. Detection of low concentrations of ampicillin in milk. **The Analyst**, [s.l.], v. 140, n. 15, p.5003-5005, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5an00864f>.
- ANVISA [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/sulfonamidas.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/sulfonamidas.htm)
- ARÊAS, Elizabeth P. G.; KAWANO, Yoshio. APLICAÇÕES DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS VIBRACIONAIS AO ESTUDO CONFORMACIONAL DE PROTEÍNAS. **Química Nova**, São Paulo, v. 1, n. 14, p.31-43, 30 set. 1990.
- AROCA, Ricardo. **Surface - enhanced Vibrational Spectroscopy**. Canada: Wiley, 2006. 262 p.
- ATKINS, Peter. Statistical thermodynamics 2: applications. In: ATKINS, Peter; PAULA, Julio de. **Physical Chemistry**. 8. ed. New York: W. H. Freeman And Company, 2006. Cap. 17. p. 589-651.
- BARALDI, C. et al. Characterization of polymorphic ampicillin forms. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 100, p.329-340, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.021>.
- BARNES, W.L.; DEREUX, A.; EBBESEN, T.W. **Nature**. v. 424, p. 824, 2003.

BEDÊ, P.M. **Produção e caracterização de nanopartículas poliméricomagnéticas para utilização biomédica**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

BENÍTEZ–MARTÍNEZ, Sandra; LÓPEZ-LORENTE, Ángela Inmaculada; VALCÁRCEL, Miguel. Multilayer graphene–gold nanoparticle hybrid substrate for the SERS determination of metronidazole. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 121, p.6-13, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.01.006>.

BERTE, R. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata conjugadas com peptídeos antimicrobianos**. 2013. 104 f. Tese (Mestrado) - Curso de Física Aplicada, Instituto de Física de São Carlos, Universidade Federal de São Paulo, São Carlo, 2013.

BEZZERA, A. M.. **Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de QBP de alta e baixa massa molecular**. 2011. 1 v. Monografia (Especialização) - Curso de Tecnologia Químico-farmacêutica, Departamento de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2011.

BRUNGER, Axel T. et al. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. **Nature**, [s.l.], v. 395, n. 6700, p.347-353, 24 set. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/26412>.

CAMDEN, J.P.; DIERINGER, J. A.; ZHAO, J.; VAN DUYNE, P. R. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1653.

CARLSSON, Gunnar; ÖRN, Stefan; LARSSON, D.g. Joakim.. EFFLUENT FROM BULK DRUG PRODUCTION IS TOXIC TO AQUATIC VERTEBRATES. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 28, n. 12, p.2656-2662, 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1897/08-524.1>.

CASANOVA, Monise Cristina Ribeiro. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química de SÃO Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CIALLA, Dana et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 403, n. 1, p.27-54, 29 dez. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5631-x>.

CDC, Centers For Disease Control And Prevention. Centers For Disease Control And Prevention; Estados unidos da américa. **Antibiotic / Antimicrobial Resistance**. 2016. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID) Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/>>. Acesso em: 15 mai. 2017.

CORIO, P. et al. Contribution of the Charge Transfer Mechanism to the Surface-Enhanced Raman Scattering of the Binuclear Ion Complex  $[\text{Fe}_2((\text{Bpe})(\text{CN})_{10})_6]^-$  Adsorbed on a Silver Electrode in Different Solvents. **Langmuir**, 1999/03/01 1999. v. 15, n. 7, p. 2500-2507.

COUTO C.M.C.M ; MONTENEGRO M.C. B. S. M. , REIS S.; **Complexação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina com o catião cobre (ii). estudo potenciométrico**. Porto: Química Nova, 16 set. 2011.

CREIGHTON, J. Alan; BLATCHFORD, Christopher G.; ALBRECHT, M. Grant. 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**, [s.l.], v. 75, p.790-798, 1979. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/f29797500790>.

DEREK AL. **The Raman Effect- A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules**- John Wiley & Sons, LTD – 2002

DERJAGUIN, B.V.; LANDAU, L.D. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Acta Physicochim URSS**, v. 14, p. 733-762, 1941.

DODD, Michael C.. Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. **Journal Of Environmental Monitoring**, [s.l.], v. 14, n. 7, p.1754-1771, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2em00006g>.

EBERT, Ina et al. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 30, n. 12, p.2786-2792, 12 out. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.678>.

EL BADAWY, A.M.; SILVA, R.G.; MORRIS, B.; SCHECKEL, K.G.;SUIDAN, M.T.; TOLAYMAT, T.M. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 283-287, 2011.

ESPADAS, David et al. Lack of effect of azithromycin on QT interval in children: a cohort study. **Archives Of Disease In Childhood**, [s.l.], v. 101, n. 11, p.1079-1079, 11 ago. 2016. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2016-310956>.

FATTA-KASSINOS, Despo; MERIC, Sureyya; NIKOLAOU, Anastasia. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 399, n. 1, p.251-275, 10 nov. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9>.

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

FASSHAUER, D. et al. Structural Changes Are Associated with Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein Attachment Protein Receptor Complex Formation. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 272, n. 44, p.28036-28041, 31 out. 1997. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.44.28036>.

FERNANDES, Patrícia Érica. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata**. 2014. 101 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

FERRARO JR, NAKAMOTO K, BROWN CW - **Introductory Raman Spectroscopy**- 2a ed, Elsevier, 2003

FILGUEIRAS, Aline Luciano. **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** Juiz de Fora **2013**. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

GALVIDIS, Inna; LAPA, Gennady; BURKIN, Maksim. Group determination of 14-membered macrolide antibiotics and azithromycin using antibodies against common epitopes. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 468, p.75-82, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.09.009>.

GARCÍA-BARRASA, J.; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA, J.; MONGE, M. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. **Central European Journal of Chemistry**, 2011. v. 9, n. 1, p. 7-19.

GARTISER, Stefan et al. Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests. **Chemosphere**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.604-613, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.038>.

GRASSESCHI, Daniel; TOMA, Henrique E.. The SERS effect in coordination chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 333, p.108-131, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2016.11.019>.

GOUSSINSKY, Eugenio (Ed.). **Superbactérias ganham força: "Podemos voltar ao tempo em que era comum morrer de infecção", diz médico francês: Contaminações já não estão restritas aos hospitais e afetam comunidades, segundo ele.** 2017. Disponível em: <<http://noticias.r7.com/saude/superbacterias-ganham-forca-podemos-voltar-ao-tempo-em-que-era-comum-morrer-de-infeccao-diz-medico-frances-03072017>>. Acesso em: 03 jul. 2017.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p.667-679, 24 fev. 2010.

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

HERING, Katharina et al. SERS: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostics. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 390, n. 1, p.113-124, 14 nov. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1667-3>.

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

HUANG, Manhong et al. Changes of bacterial diversity and tetracycline resistance in sludge from AAO systems upon exposure to tetracycline pressure. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 298, p.303-309, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.039>.

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

ILLUM, L. Chitosan and its uses as pharmaceutical excipient. **Pharm. Res.**, v.15, p.1326-1331, 1998.

ISLAN, German A. et al. Characterization of smart auto-degradative hydrogel matrix containing alginate lyase to enhance levofloxacin delivery against bacterial biofilms. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 496, n. 2, p.953-964, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.050>.

JI, Wei; YAO, Weirong. Rapid surface enhanced Raman scattering detection method for chloramphenicol residues. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 144, p.125-130, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.02.029>.

JIANG, Xin et al. Rapid monitoring of benzylpenicillin sodium using Raman and surface enhanced Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 140, p.474-478, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.01.016>.

JIN, di et al. SERS detection of expired tetracycline hydrochloride with an optical fiber nano-probe. **Anal. Methods**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.1307-1312, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4ay02725f>.

KARPOV, S. V.; GERASIMOV, V. S.; ISAEV, I. L.; PODAVALOVA, O. P.; SLABKO, V. V. *Colloid Journal*, **2006**, 69, 159.

KNEIPP, K. et al. Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman Spectroscopy. **Chemical Reviews**, 1999/10/01 1999. v. 99, n. 10, p. 2957-2976.

KÜMMERER, Klaus. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 90, n. 8, p.2354-2366, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023>.

LAMEIRAS, F.S.; SOUZA, A.L.; MELO, V.A.R.; NUNES, E.H.; BRAGA, I.D. Measurement of the zeta potential of planar surfaces with a rotating disk. **Material Research**, v. 11, p. 217-219, 2008.

LE RU, E. C. et al. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: Comprehensive Study. **The Journal of Physical Chemistry C**, 2007/09/01 2007. v. 111, n. 37, p. 13794-13803.

- LI, Yuan; WEI, Dongbin; DU, Yuguo. Oxidative transformation of levofloxacin by  $\delta$ -MnO<sub>2</sub>: Products, pathways and toxicity assessment. **Chemosphere**, [s.l.], v. 119, p.282-288, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.064>.
- MAILLARD, Jean-yves; HARTEMANN, Philippe. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. **Critical Reviews In Microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.373-383, 28 ago. 2012. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841x.2012.713323>.
- MCCREERY, R. L. **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis**. Wiley. New York: 2000. 420 p.
- MELO, V. H. S.; ZAMARION, V. M.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. *J. Raman Spectrosc.* **2011**, 42, 644.
- MICHAELS, A. M.; NIRMAL, M.; BRUS, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9932
- MILLEN, Ricardo P.; FARIA, Dalva Lúcia A. de; TEMPERINI, Marcia L. A.. Modelos para dispersão raman em polímeros conjugados. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p.289-295, fev. 2005.
- MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, 2005. v. 16, n. 10, p. 2346.
- MORTON, S. M.; SILVERSTEIN, D. W.; JENSEN, L. Theoretical Studies of Plasmonics using Electronic Structure Methods. **Chemical Reviews**, 2011/06/08 2011. v. 111, n. 6, p. 3962-3994.
- MOSKOVITS, M. Surface selection rules. **The Journal of Chemical Physics**, 1982. v. 77, n. 9, p. 4408-4416.
- MOSKOVITS, Martin. Surface-enhanced spectroscopy. **Reviews Of Modern Physics**, Canada, v. 57, n. 3, p.783-828, jul. 1985.
- NATAN, M. J. Concluding Remarks Surface enhanced Raman scattering. **Faraday Discussions**, 2006. v. 132, p. 321-328.
- NICOLAOU, K. C.; Montagnon, T.; *Molecules that Changed the World*, Wiley-VCH: Weinheim, 2008, cap. 13.
- OLIVEIRA, G.M.; **Simetria de Moléculas e Cristais – Fundamentos da Espectroscopia Vibracional**; bookman 2009.

OLIVEIRA, L.b.s. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.511-523, jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15\\_222](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_222).

PALAFIX, M. Alcolea. Vibrational frequencies, conformations and geometry of procaine. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 1, n. 6, p.149-165, 7 maio 1993.

PARK, Jin-ho et al. A Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR)-based, simple, receptor-free and regeneratable Hg<sup>2+</sup> detection system. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 307, p.137-144, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.040>.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: Conceitos e aplicações*. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 2007. Vol. 2, 524 p.

PICÓ, Yolanda; ANDREU, Vicente. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 387, n. 4, p.1287-1299, 3 nov. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-0843-1>.

POIRIER, Michelle A. et al. The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. **Nature Structural Biology**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.765-769, set. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/1799>.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. The Raman Effect. **Nature** 1928, 121, 501

RODRIGUES, Daniel C. et al. Critical assessment of enhancement factor measurements in surface-enhanced Raman scattering on different substrates. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, [s.l.], v. 17, n. 33, p.21294-21301, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4cp05080k>.

RU, Eric Le; ETCHEGOIN, Pablo. **Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy**: and related plasmonic effects. New Zealand: Elsevier, 2009. 663 p.

SALA, Oswaldo. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. São Paulo: Unesp, 2008.

SANT'ANA, A. C.; CORIO, P.; TEMPERINI, M. L. A. O efeito SERS na análise de traços: o papel das superfícies nanoestruturadas. **Química Nova**, 2006. v. 29, p. 805-810.

SANTOS, Lucilaine Valéria de Souza; MEIRELES, Alexandre Moreira; LANGE, Liséte Celina. Degradation of antibiotics norfloxacin by Fenton, UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 154, p.8-12, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.02.021>.

SHENDE, Chetan et al. Drug Stability Analysis by Raman Spectroscopy. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.651-662, 22 dez. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics6040651>.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS K. S. C. R.; FERREIRA E. I. **QBP: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços**. Química Nova, 2006. Vol. 29, No. 4, 776-785.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1047-1067, 2001.

SONG, Jibin et al. Plasmonic Vesicles of Amphiphilic Nanocrystals: Optically Active Multifunctional Platform for Cancer Diagnosis and Therapy. **Accounts Of Chemical Research**, [s.l.], v. 48, n. 9, p.2506-2515, 15 set. 2015. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00059.

SOUZA, Nelson Luis Gonçalves Dias de. **Estudo da degradação de polímeros e blends aplicados à bovinocultura**. 2015. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

STURINI, Michela et al. Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 17, p.5575-5582, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.043>.

UNGUREAN, Alia et al. Adsorption of sulfamethoxazole molecule on silver colloids: A joint SERS and DFT study. **Journal Of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1073, p.71-76, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.05.074>.

VAN HYNING, Dirk L.; ZUKOSKI, Charles F.. Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles. **Langmuir**, [s.l.], v. 14, n. 24, p.7034-7046, nov. 1998. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la980325h>.

Walsh, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.

WANG, Chunyan et al. Detection and analysis of SERS effect of nano gold by self-assembly chemical plating composite method. **Applied Surface Science**, [s.l.], v. 353, p.750-756, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.05.083>.

WARTEWIG S - IR and Raman Spectroscopy, Fundamental Processing - WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim – 2003

WEBER, Thomas et al. SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion. **Cell**, [s.l.], v. 92, n. 6, p.759-772, mar. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81404-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81404-x).

WU, D-Y.; DUAN, S.; REN, B.; TIAN, Z-Q. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 533.

WU, Chendi et al. Studying bubble–particle interactions by zeta potential distribution analysis. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 449, p.399-408, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.01.040>.

VILLAR, S.E.J , EDWARDS, H.G.M. - **Raman spectroscopy in astrobiology**, Anal Bioanal Chem 2006, 384: 100–113

XU, H.; BJERNELD, E. J.; KÄLL, M. BÖRGESSON, L.; *Phys. Rev. Lett.* **1999**, 83, 4357.

XU, H.; AIZPURUA, J.; KÄLL, M.; APELL, P. *Phys Rev. E* **2000**, 62, 4318.

YANG, Yoosoo et al. Dynamic light scattering analysis of SNARE-driven membrane fusion and the effects of SNARE-binding flavonoids. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 465, n. 4, p.864-870, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.111>.

YE, A.; SINGH, H. Adsorption behaviour of lactoferrin in oil-in-water emulsions as influenced by interactions with  $\alpha$ -lactoglobulin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 295, n. 1, p. 249-254, 2006.

ZAMARION, Vitor de Moraes. **Funcionalização de Nanopartículas Plasmônicas para o Desenvolvimento de Sensores SERS**. 2012. 252 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ZHAO, Liu-bin et al. A DFT study on photoinduced surface catalytic coupling reactions on nanostructured silver: selective formation of azobenzene derivatives from para-substituted nitrobenzene and aniline. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 14, n. 37, p.12919-12929, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2cp41502j>.

ZHANG, Yingjie et al. Organic acids enhance bioavailability of tetracycline in water to *Escherichia coli* for uptake and expression of antibiotic resistance. **Water Research**, [s.l.], v. 65, p.98-106, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.021>.

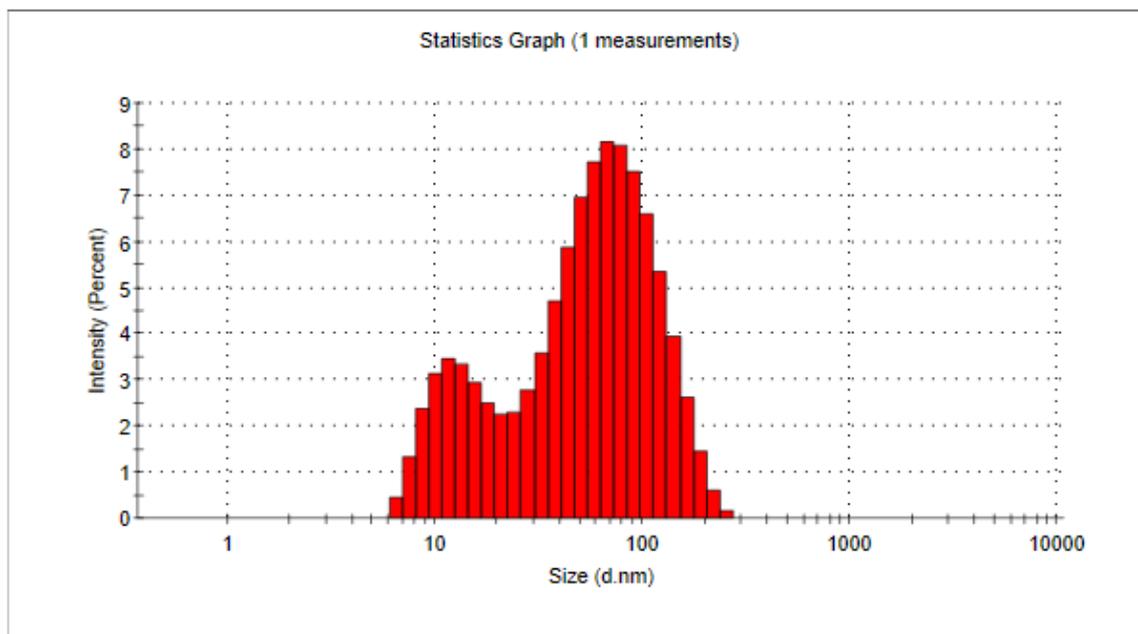
ZHU, XIAOQIAN et al. BOOK REVIE. Application of nanomaterials in the bioanalytical detection of disease-related genes. **Biosensors and bioelectronics**, [s.l.], v. 57, n. 74, p.113-133, 22 abr. 2015. Disponível em: <<http://www-sciencedirect-com.ez25.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0956566315300713>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

ZIMOCZ-KORZYCKA, Anna; JARMOLUK, Andrzej. The use of chitosan, lysozyme, and the nano-silver as antimicrobial ingredients of edible protective hydrosols applied into the surface of meat. **Journal Of Food Science And Technology**, [s.l.], v. 52, n. 9, p.5996-6002, 26 nov. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-014-1645-7>.

## ANEXOS

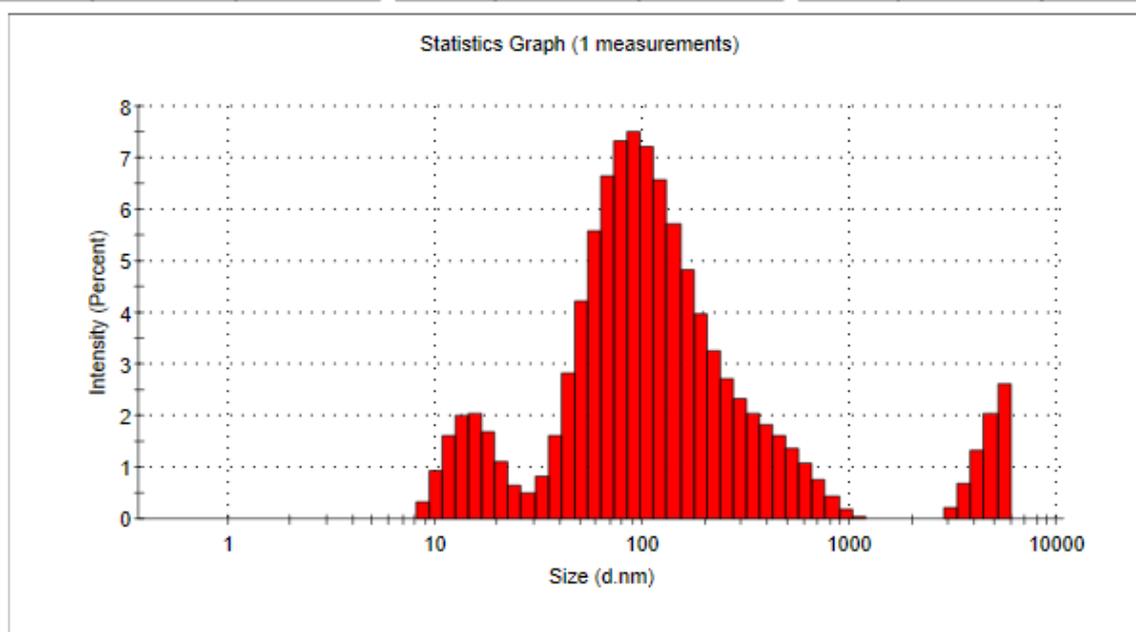
### ANEXO A

Espalhamento DLS Col G pH 3,0.



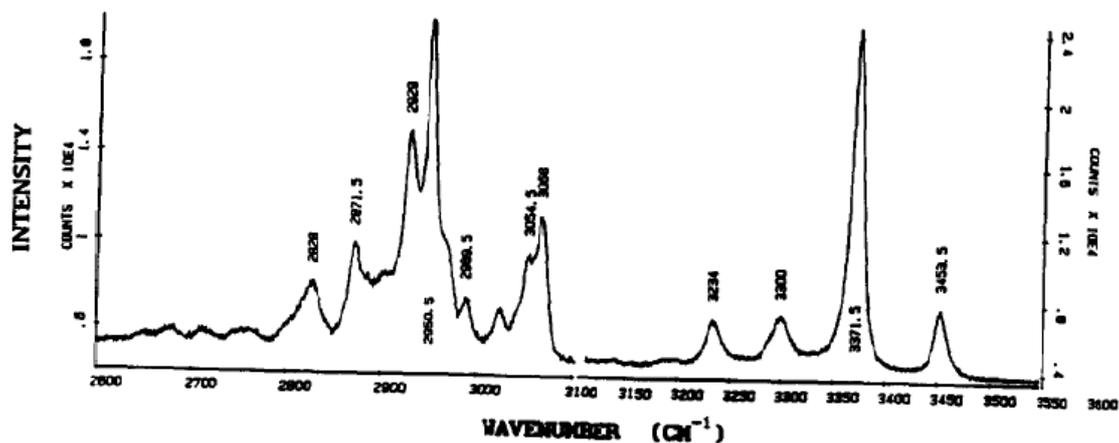
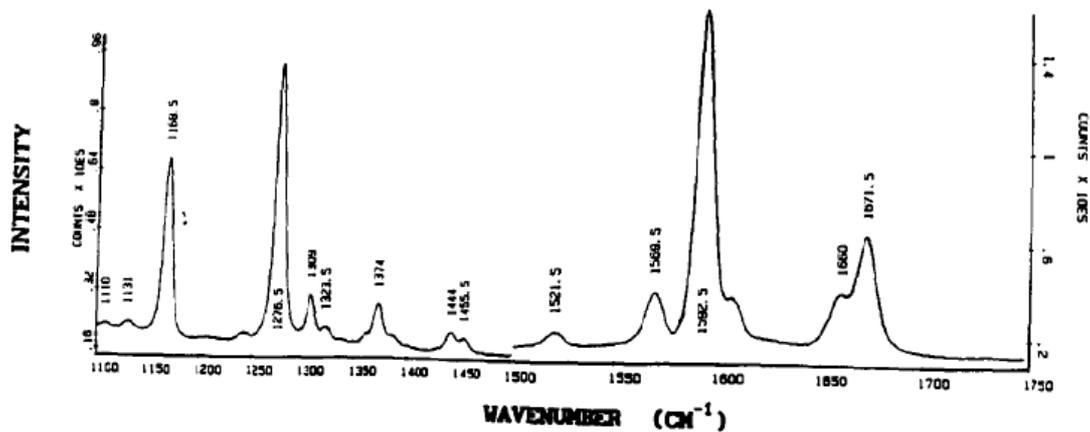
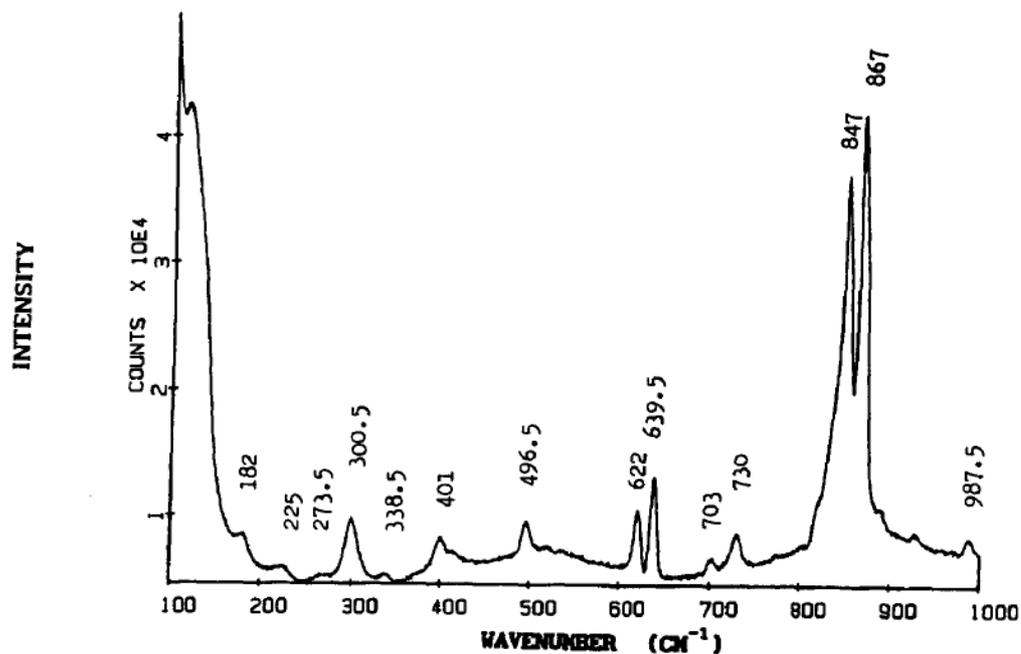
### ANEXO B

Espalhamento DLS Col G pH 5,0.



## ANEXO C

Espectro Raman da Procaína, retirada do artigo de Palafox (1993)



## ANEXO D

### PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretende-se ainda a publicação de artigos onde serão discutidos o estudo da adsorção dos ATB (AZ, CE e CL) sobre a superfície da prata, o efeito sinérgico da associação das AgNPs com QT e a influência do pH, e a parte biológica associando os resultados do *Checkboard*, com o tamanho das AgNps e a estabilidade do Col G de acordo as análises do potencial zeta.

Como perspectiva, pretende-se avaliar a lista publicada pela OMS em fevereiro de 2017, sobre bactérias que são resistentes a vários ATBs de primeira escolha e que, segundo a agência da Organização das Nações Unidas (ONU), devem ser prioridade nas pesquisas por novos antimicrobianos contra esses micróbios. Pretende-se avaliar e estudar os ATBs que são de primeira escolha para esses microrganismos e que não mais estão fazendo efeito, para avaliar se o sinergismo encontrado nas associações desse trabalho se estende para outros ATBs.