

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Hugo Camarano Belgo**

**Adsorções de proteínas em superfícies nanoestruturadas de prata caracterizadas  
por espectroscopia SERS**

**Juiz de Fora**

**2022**

**Hugo Camarano Belgo**

**Adsorções de proteínas em superfícies nanoestruturadas de prata caracterizadas  
por espectroscopia SERS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana

**Juiz de Fora**

**2022**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Belgo, Hugo Camarano.

Adsorções de proteínas em superfícies nanoestruturadas de prata caracterizadas por espectroscopia SERS / Hugo Camarano Belgo. -- 2022.

91 f.

Orientador: Antonio Carlos Sant'Ana

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.

1. Proteínas. 2. Espectroscopia SERS. I. Sant'Ana, Antonio Carlos, orient. II. Título.

**Hugo Camarano Belgo**

**Adsorções de proteínas em superfícies nanoestruturadas de prata caracterizados por espectroscopia SERS**

Dissertação  
apresentada ao  
Programa de Pós-  
Graduação em  
Química  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Mestre em  
Química. Área de  
concentração: Físico-  
Química.

Aprovada em 04 de março de 2022.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana** - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dr. Humberto de Mello Brandão**  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**Profa. Dra. Celly Mielko Shinohara Izumi**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 18/02/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Sant Ana, Professor(a)**,

PROPP 013: Termo de Aprovação COORD-PPG-QUÍMICA 0685535

SEI 23071.963271/2022-25 / pg. 1



em 04/03/2022, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celly Mleko Shinohara Izumi, Professor(a)**, em 04/03/2022, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto de Mello Brandão, Usuário Externo**, em 04/03/2022, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0685535** e o código CRC **1012E04B**.

Dedico este trabalho à minha mãe, meu pai, minha irmã, minha tia Denise e minha namorada, que sempre me apoiaram em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Fazer um curso de pós-graduação não é fácil para ninguém, e no meu caso não seria diferente, por isso somente com ajuda e apoio de muitos tornou-se possível chegar a esse momento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus e a Virgem Maria, por todas as oportunidades e acolhimentos durante todo esse caminho.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer minha mãe Valeria por toda dedicação, desde sempre, através de orientação, apoio, amor e tudo mais que uma pessoa de sorte pode possuir. Ela foi e é meu maior exemplo de vida e, se hoje eu conquisto algo, essa conquista também é dela. Destaco também a importância do meu pai Heli e minha irmã Camila, pois sem o apoio deles nada disso seria possível. Outro exemplo que eu tenho em casa desde sempre é da minha tia Denise, que sempre me apoiou e se preocupou com meu futuro, sem ela, nem de São João Del Rei (minha cidade de origem) eu teria saído. A vocês quatro, minha eterna gratidão! Agradeço também a todos os tios, primos e minha avó por sempre me apoiarem.

Não posso esquecer também da minha namorada Beatriz, que me acompanha desde o começo do meu mestrado, me apoiando, consolando e me fazendo persistir por todo esse período. Graças ao seu amor, cuidado, carinho e suporte, eu estou aqui escrevendo essas palavras. Muito obrigado por você ser você, te amo!

Aos amigos, que graças a Deus eu tenho muitos, só tenho a agradecer por toda ajuda! Em destaque, o meu grande amigo Bismark, que me ajudou muito durante todo o período do mestrado, através de sugestões, correções e até algumas orientações em alguns momentos. Meu grande amigo Bismark, muito obrigado por tudo! Outra pessoa que eu não poderia esquecer é a Nathália, que sempre esteve ao meu lado desde a graduação me ajudando no que podia, muito obrigado Nat! Outras pessoas importantes que a química me deu, e que sempre me deram muito suporte, foram Layce, Pâmela, Guilherme, Hudson, Paulo, Thais e William. Fora da química, agradeço aos meus amigos Tales, Leo, Aloízio, Diogo, Rodrigo, Felipe, Walkiria e Marla que estiveram ao meu lado nos momentos para relaxar e extravasar todos os problemas maçantes do dia a dia. Gratidão por vocês na minha vida!

Sobre meu grupo de pesquisa LabNano, eu não posso esquecer do Bruno, que foi a primeira pessoa que me orientou com bastante paciência, além dos outros amigos que me ajudaram muito e que já foram embora como Aline, Patrícia, Debora, Linus, Erix e Bia, bem como os que ainda estão presentes que continuaram me ajudando como Pedro, Flávia, Gabriela, Daphne, Moyra, Álvaro e Rafael. Meu muito obrigado a todos! Foi um prazer estar

com todos vocês, eu aprendi muito e, com certeza, nossas vivências contribuíram bastante para mim! Agradeço também aos professores responsáveis pela estrutura do laboratório NEEM para a realização deste projeto! Muito obrigado!

Outras pessoas, presentes ali no prédio de materiais, que sempre me ajudaram são os alunos da física como o Nayton, Giovani, Alessandro e o Fábio. Vocês também contribuíram muito com meu trabalho!

Agradeço ao meu orientador Dr. Antonio Carlos por toda paciência, paciência e mais paciência comigo, que me aceitou como IC em uma época da minha vida que eu não sabia direito o que eu queria, mas mesmo assim me deu a oportunidade de estar ali até os dias de hoje. Meu muitíssimo obrigado por tudo!

Aos professores que fazem parte do meu grupo de pesquisa, Dr. Gustavo e Dra. Celly que, seja dentro de sala de aula, em reuniões de grupo ou nos corredores, todas as dúvidas e questões que eu apresentava sempre foram respondidas. Muito obrigado por todas as contribuições!

Aos demais professores do departamento de química que sempre me trataram com muito respeito e me auxiliaram. Meu muito obrigado a todos!

Aos técnicos de laboratório, em especial ao meu grande amigo Fernando, aos auxiliares da limpeza, que graças a eles tudo se mantinha organizado e limpo e só assim o trabalho podia ser realizado, aos funcionários administrativos e aos agentes de segurança do instituto. A partir de toda essa estrutura funcionando é que nós, alunos, podemos realizar o nosso trabalho. Meu muito obrigado a todos!

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento que possibilitou a realização dos projetos de pesquisa, em especial deste em questão, e à Universidade Federal de Juiz de Fora, por fazer parte da minha vida desde quando eu era um aluno do curso de bacharelado em ciências exatas.



## RESUMO

As proteínas são macromoléculas que desempenham diversas funções vitais nos organismos, sendo constituídas por cadeias de aminoácidos. A partir do uso da espectroscopia de Espalhamento Raman Intensificado por Superfície (*Surface Enhanced Raman Scattering - SERS*) foi possível investigar os mecanismos de interação entre o aminoácido L-Metionina (MET), o dipeptídeo L-Carnosina (CAR), a proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) e os anticorpos anti-Albumina de Soro Bovino (anti-BSA) e anti-receptor de folato (anti-FOL) com a superfície nanoestruturada contendo nanopartículas de prata (AgNPs). Através da espectroscopia de absorção nas regiões UV-VIS-NIR foi monitorada a ressonância do plásmon de superfície localizado (*Localized surface plasmon resonance - LSPR*) das nanopartículas sintetizadas antes e depois da centrifugação/ressuspensão em meio aquoso, para que se tivesse uma estimativa inicial da distribuição de tamanhos, a qual foi precisada pelo Espalhamento dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering - DLS*) que resultou em um valor médio por volta de 21 nm antes, e em 25 nm depois da centrifugação/ressuspensão. A carga superficial de  $-43,1$  mV antes e de  $5,94$  mV depois da centrifugação/ressuspensão foi medida, indicando a estabilidade coloidal. As superfícies nanoestruturadas de prata (AgNS), foram construídas sobre uma placa de vidro, e no caso das amostras de proteínas, a superfície metálica foi modificada com 2-Mercaptoetanol (ME). Nas superfícies com a presença do modificador de superfície gerador de ligações de hidrogênio, as proteínas foram adsorvidas preservando um único padrão espectral SERS. Na ausência do ME, as proteínas apresentaram diferentes geometrias de adsorção e, portanto, diferentes padrões espectrais SERS, indicando que o ME ancora as macromoléculas na superfície de prata. Através da atribuição vibracional foi proposto que a tirosina está envolvida na formação de ligações de hidrogênio com o ME, servindo de pontos de ancoramento para a adsorção das três proteínas.

**Palavras-chave:** Proteínas. Espectroscopia SERS. Modificadores de superfície. Transição LSPR.

## ABSTRACT

Proteins are macromolecules that perform several vital functions in organisms, being made up of chains of amino acids. Using Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) spectroscopy, it was possible to investigate mechanisms of interaction between the amino acid L-Methionine (MET), the dipeptide L-Carnosine (CAR), the protein of Bovine Serum Albumin (BSA) and Anti-Bovine Serum Albumin antibody (Anti-BSA) and Anti-folate receptor antibody (Anti-FOL) antibodies with the surface of nanostructured containing silver nanoparticles (AgNPs). Through UV-VIS-NIR spectroscopy, the localized surface plasmon resonance (LSPR) of the synthesized nanoparticles was monitored before and after centrifugation/resuspension in aqueous medium, in order to have an initial estimate of the size distribution, which was obtained by Dynamic Light Scattering (DLS), which resulted in an average value around 21 nm before and at 25 nm after centrifugation/resuspension. The surface charge of -43,1 mV before and 5,94 mV after centrifugation/resuspension was measured, indicating colloidal stability. The nanostructured silver surfaces (AgNS) were built on a glass plate, and in the case of protein samples, the metallic surface was modified with 2-Mercaptoethanol (ME). In the surfaces with the presence of this surface modifier generator of hydrogen bonds, the proteins were adsorbed preserving a unique spectral pattern SERS. In the absence of ME, the proteins showed different adsorption therefore, different SERS spectral patterns indicating that ME anchors macromolecules on the silver surface. Through vibrational assignment it was proposed tyrosine is involved in the formation of hydrogen bonds with ME, working as anchorage points for the adsorption of three proteins.

**Keywords:** Proteins. SERS spectroscopy. Surface Modifiers. LSPR transition.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura geral dos aminoácidos .....	17
Figura 2 - Estrutura da L-Carnosina .....	18
Figura 3 - Representação das quatro estruturas das proteínas .....	19
Figura 4 - Estrutura geral dos anticorpos .....	21
Figura 5 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs com morfologia de morfologia de nanoplanos .....	22
Figura 6 - Exemplo da oscilação coletiva dos elétrons, no caso, em nanoestruturas esféricas	23
Figura 7 - Ilustração do espalhamento Stokes/Rayleigh/Anti-Stokes .....	27
Figura 8 - Fator de qualidade para diferentes metais na região espectral do visível e infravermelho próximo .....	30
Figura 9 - Espectro UV-VIS-NIR da suspensão coloidal avermelhada (A), alaranjada (B) e arroxeada (C) .....	41
Figura 10 - Espectro UV-VIS-NIR das suspensões AgNPs antes da centrifugação (A), após centrifugação e ressuspensão (B) e os mesmos espectros plotados junto (C) .....	43
Figura 11 - Resultado da análise do DLS da suspensão aquosa de AgNPs tamanho por intensidade (A) e tamanho por volume (B) .....	44
Figura 12 - Resultado da análise do DLS da suspensão aquosa de AgNPs após a ressuspensão em meio aquoso tamanho por intensidade (A) e tamanho por volume (B) .....	44
Figura 13 - Análise do potencial Zeta da suspensão aquosa de AgNPs (A) e após a centrifugação/ressuspensão em meio aquoso (B) .....	45
Figura 14 - Estrutura do CV .....	46
Figura 15 - Espectro Raman do CV (A), após a correção da linha base (B) e posterior ajuste <i>smooth</i> no espectro (C) .....	47
Figura 16 - Espectro SERRS e SERS do CV adsorvido na superfície do AgNS utilizando linha laser com radiação de comprimento de onda 632,8 nm (A) e com radiação de comprimento de onda 785 nm (B), respectivamente .....	48
Figura 17 - Espectro Raman do CV no estado sólido utilizando a radiação incidente de comprimento de onda de 632,8 nm (A), espectro Raman do CV após ajustes (B), espectro SERRS do CV utilizando radiação incidente do laser com comprimento de onda de 632,8 nm (C) e espectro SERS do CV utilizando radiação incidente do laser com comprimento de onda de 785 nm (D) .....	49
Figura 18 - Estrutura neutra da MET (A) e sua estrutura zwitteriônica (B) .....	50

Figura 19 - Espectro Raman da MET em estado sólido.....	51
Figura 20 - Mapeamento SERS de 36 pontos da MET adsorvida na AgNS.....	51
Figura 21 - Seleção de 8 espectros do mapeamento SERS de 36 pontos da MET adsorvida na AgNS .....	52
Figura 22 - Espectro SERS média da MET (A) e o espectro SERS média da MET após os ajustes (B).....	52
Figura 23 - Espectro SERS da MET adsorvida na AgNS (A) e espectro Raman da MET (B)	53
Figura 24 - Estrutura da L-Carnosina.....	54
Figura 25 - Espectro Raman da L-Carnosina em estado sólido .....	54
Figura 26 - Mapeamento SERS de 36 pontos da CAR adsorvida na AgNS.....	55
Figura 27 - Seleção de um espectro do mapeamento SERS de 36 pontos da CAR adsorvida na AgNS .....	55
Figura 28 - Espectro SERS da CAR adsorvida na AgNS (A) e espectro Raman da CAR (B)	56
Figura 29 - Estrutura do ME.....	57
Figura 30 - Espectro SERS do ME adsorvido na AgNS (A), espectro SERS do ME com linha base corrigida (B) e após o uso da ferramenta <i>smooth</i> (C).....	58
Figura 31 - Espectros SERS com grande reprodutibilidade (A) e (B) .....	59
Figura 32 - Estrutura da proteína BSA (4F5S) em 3D .....	60
Figura 33 - Espectro Raman do sólido da BSA.....	60
Figura 34 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da BSA adsorvida na AgNS.....	61
Figura 35 - Seleção de 9 espectros que representam o padrão espectral em maioria presente no mapeamento SERS .....	62
Figura 36 - Espectro SERS médio da BSA, obtido dos espectros selecionados do mapeamento SERS.....	62
Figura 37 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da BSA na presença de ME adsorvidas na AgNS .....	63
Figura 38- Seleção dos 20 espectros com padrão espectral semelhante presente no mapeamento SERS .....	64
Figura 39 - Espectro soma daqueles selecionados no mapeamento SERS antes (A) e após a correção da linha base (B) .....	65
Figura 40 - Espectros SERS da BSA adsorvida na AgNS na presença (A), e na ausência do ME (B), espectro SERS do ME adsorvido na AgNS (C) e espectro Raman do sólido de BSA (D) .....	65

Figura 41 - Espectros SERS da BSA adsorvida na AgNS na presença do ME com diferentes valores de potências aplicadas .....	68
Figura 42 - Espectro SERS da BSA adsorvida na AgNS na presença do ME a partir do uso da síntese avermelhada (A), a partir da síntese alaranjada (B) e a partir da síntese arroxeadada (C). .....	69
Figura 43 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-BSA adsorvida na AgNS ..	70
Figura 44 - Seleção de 5 espectros presentes no mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-BSA adsorvida na AgNS .....	71
Figura 45 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-BSA adsorvida na AgNS na presença do ME .....	72
Figura 46 - Seleção de 5 espectros presentes no mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-BSA adsorvida na AgNS .....	72
Figura 47 - Espectro soma dos 5 espectros (A) e espectro soma dos 5 espectros após correção da linha base (B) .....	73
Figura 48 - Espectro SERS da Anti-BSA adsorvida na AgNS na presença do ME (A) e espectro SERS do ME adsorvido na AgNS (B) .....	74
Figura 49 - Espectro Raman da solução de Anti-FOL gotejada sobre lâmina de vidro .....	75
Figura 50 - Espectro Raman da Anti-FOL após a correção da linha base (A) e o espectro Raman da solução de Anti-FOL após ajuste <i>smooth</i> (B).....	76
Figura 51 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros do Anti-FOL adsorvido na AgNS ..	76
Figura 52 - Seleção de 7 espectros presentes no mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-FOL adsorvida na AgNS .....	77
Figura 53 - Espectro média dos 7 espectros (A) e espectro média dos 7 espectros após correção da linha base (B) .....	78
Figura 54 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-FOL adsorvido na AgNS na presença do ME .....	78
Figura 55 - Seleção de 5 espectros presentes no mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-FOL adsorvido na AgNS .....	79
Figura 56 - Espectro soma dos 5 espectros selecionados do mapeamento realizado .....	80
Figura 57 - Espectro SERS do Anti-FOL na presença do ME adsorvido na AgNS (A), espectro SERS do ME adsorvido na AgNS (B), espectro SERS do Anti-FOL adsorvido na AgNS na ausência do ME (C) e o espectro Raman do Anti-Fol (D)	80
Figura 58 - Estrutura dos aminoácidos triptofano (A) e tirosina (B).....	82

Figura 59 - Espectro SERS do Anti-FOL adsorvido na AgNS na presença do ME (A), espectro SERS da Anti-BSA adsorvida na AgNS na presença do ME (B) espectro SERS da BSA adsorvida na AgNS na presença do ME (C).....	82
Figura 60 - Estrutura do aminoácido Cistina.....	83
Figura 61 - Tentativa de representação dos filmes construídos na ausência (A) e na presença (B) do ME .....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aminoácidos presentes na proteína BSA .....	20
Tabela 2 – Modos vibracionais das Amidas .....	27
Tabela 3 – Condições de medidas dos espectros/mapeamentos SERS das moléculas.....	35
Tabela 4 – Condições de medidas dos espectros Raman das moléculas .....	36
Tabela 5 – Superfícies nanoestruturadas construídas .....	38
Tabela 6 – Superfícies nanoestruturadas construídas na presença do ME .....	39
Tabela 7 – Número de onda em $\text{cm}^{-1}$ dos espectros da figura 40 e atribuições baseadas na literatura .....	67
Tabela 8 – Bandas presentes nos espectros SERS (Anti-BSA, Anti-FOL e BSA) .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs	Nanopartículas de Prata
AgNS	Superfície nanoestruturada de Prata
Anti-BSA	Anticorpo anti-Albumina de Soro Bovino
Anti-FOL	Anticorpo anti-receptor de folato
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> )
Cadeia H	Cadeia Pesada (do inglês <i>Heavy</i> )
Cadeia L	Cadeia Leve (do inglês <i>Light</i> )
CAR	L-Carnosina
CV	Cristal Violeta
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico (do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i> )
HSA	Albumina de Soro Humano (do inglês <i>Human Serum Albumin</i> )
LSPR	Ressonância do plasmón de superfície localizado (do inglês <i>Localized Surface Plasmon Resonance</i> )
ME	2-Mercaptoetanol
MET	L-Metionina
MNPs	Nanopartículas Metálicas
OH <sup>-</sup>	Íon hidroxila
Região Fab	Fab (do inglês <i>Fragment Antigen Binding</i> )
Região Fc	Fc (Fragmento Cristalizável)
SERS	Espalhamento Raman intensificado por superfície (do inglês <i>Surface Enhanced Raman Scattering</i> )
SERRS	Espalhamento Raman Ressonante intensificado por superfície (do inglês <i>Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering</i> )
UV-VIS-NIR	Ultravioleta-visível-infravermelho próximo
v	Estiramento ( <i>stretching</i> )
$\delta$	Deformação angular no plano
ib	Flexão do plano



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1	AMINOÁCIDOS, PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS .....	17
1.2	NANOCIÊNCIA-NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PLASMÔNICAS.....	21
1.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	23
1.3.1	<b>Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta .....</b>	<b>23</b>
1.3.2	<b>Espalhamento de absorção no UV-VIS-NIR.....</b>	<b>24</b>
1.3.3	<b>Espectroscopia Raman e Efeito SERS (Espalhamento Raman Intensificado por Superfície (SERS)).....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
3.1	INSTRUMENTAÇÃO .....	33
<b>3.1.1</b>	<b>Espectrômetro de absorção UV-VIS-NIR .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.2</b>	<b>DLS e Potencial Zeta .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Espectrômetro Raman .....</b>	<b>34</b>
3.2	MAPEAMENTOS SERS, CONDIÇÕES DE MEDIDAS E A RELAÇÃO DA POTÊNCIA NOMINAL E POTÊNCIA REAL.....	34
3.3	REAGENTES E SOLVENTES.....	36
3.4	SÍNTESE DAS AgNPs DISPERSAS EM MEIO AQUOSO.....	36
3.5	CONSTRUÇÃO DAS SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS DE PRATA.....	37
<b>3.5.1</b>	<b>Limpeza das lâminas de vidro .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Preparo das suspensões de AgNPs .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Obtenção das superfícies nanoestruturadas de prata .....</b>	<b>37</b>
3.5.3.1	<i>Obtenção das superfícies nanoestruturadas de prata-Método 1 .....</i>	<i>38</i>
3.5.3.2	<i>Obtenção das superfícies nanoestruturadas-Método 2 .....</i>	<i>38</i>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>40</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA SÍNTESE DE AgNPs .....	40
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SERS DAS SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS DE AgNPs (AGNS) .....	46
<b>4.2.1</b>	<b>Caracterização Raman e SERS utilizando o CV como molécula de prova.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Caracterização Raman e SERS da molécula MET .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Caracterização Raman e SERS da molécula CAR.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Mapeamentos SERS das proteínas .....</b>	<b>57</b>

4.2.4.1	<i>Espectro SERS obtido do ME</i> .....	57
4.2.4.2	<i>Padrões espectrais presentes em todos os mapeamentos realizados</i> .....	58
<b>4.2.5</b>	<b>Caracterização Raman e SERS da proteína BSA</b> .....	<b>59</b>
4.2.5.1	<i>Espectro Raman da molécula BSA</i> .....	60
4.2.5.2	<i>Espectros SERS da molécula BSA adsorvida na AgNS na ausência do ME</i> .....	61
4.2.5.3	<i>Espectros SERS da molécula BSA adsorvida na AgNS na presença do ME</i> .....	63
4.2.5.4	<i>Efeito da potência nas amostras</i> .....	67
4.2.5.5	<i>Reprodutibilidade de sinal</i> .....	68
<b>4.2.6</b>	<b>Caracterização SERS do anticorpo Anti-BSA</b> .....	<b>69</b>
4.2.6.1	<i>Espectros SERS da molécula Anti-BSA adsorvida na AgNS na ausência do ME</i> .....	70
4.2.6.2	<i>Espectros SERS da molécula Anti-BSA adsorvida na AgNS na presença do ME</i> .....	71
<b>4.2.7</b>	<b>Caracterização Raman e SERS do anticorpo Anti-FOL</b> .....	<b>75</b>
4.2.7.1	<i>Espectro Raman da molécula Anti-FOL</i> .....	75
4.2.7.2	<i>Espectros SERS da molécula Anti-FOL adsorvida na AgNS na ausência do ME</i> .....	76
4.2.7.3	<i>Espectros SERS da molécula Anti-FOL adsorvida na AgNS na presença do ME</i> .....	78
<b>4.2.8</b>	<b>Observações acerca dos espectros SERS das proteínas</b> .....	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>86</b>

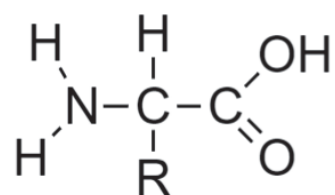
## 1 INTRODUÇÃO

Nas seções abaixo serão apresentadas informações acerca dos aminoácidos, peptídeos e proteínas. Além disso, uma breve explicação sobre nanociência com foco nas nanopartículas metálicas plasmônicas, e ainda, sobre as técnicas utilizadas para a realização deste trabalho, como é o caso do espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, e das espectroscopias UV-VIS-NIR e Raman, além do efeito associado a essa última, que é o efeito SERS.

### 1.1 AMINOÁCIDOS, PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS

Os aminoácidos são unidades básicas na composição das estruturas de peptídeos e proteínas, sendo divididos em dois grupos: não essenciais (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, prolina, serina e tirosina) e essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008). São considerados essenciais aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo humano, apenas ingeridos através de alimentos (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008). A Figura 1 apresenta a estrutura geral dos aminoácidos, contendo o grupo amina e ácido carboxílico característicos em suas estruturas e o grupo “R”, representando a cadeia lateral que irá variar de acordo com cada aminoácido.

Figura 1 - Estrutura geral dos aminoácidos.



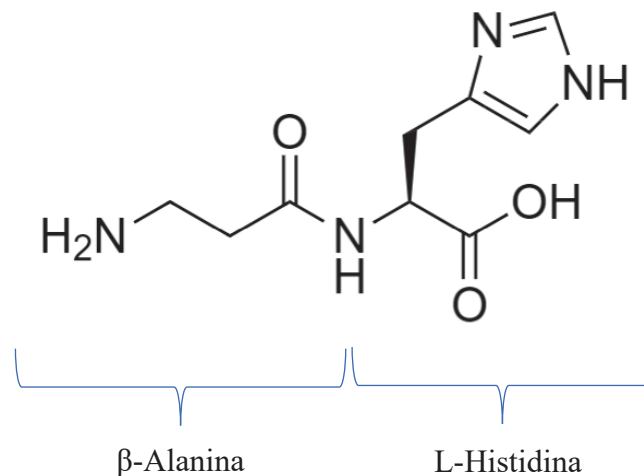
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Quando dois ou mais aminoácidos são ligados entre si por ligações peptídicas formam-se os chamados peptídeos. Os peptídeos podem ser classificados como dipeptídeos, constituídos por dois aminoácidos (NAVARRETE *et al.*, 1995), oligopeptídeos que são cadeias constituídos por até 20 aminoácidos (NELSON; COX, 2014) e os polipeptídios que são cadeias compostas por mais de 20 aminoácidos (RABOLT *et al.*, 1977). Essas

biomoléculas podem exercer diversas funções no organismo humano, atuando por exemplo, como hormônios, antibióticos naturais e até neurotransmissores (MACHADO *et al.*, 2004).

Um exemplo de um dipeptídeo é a L-Carnosina (Figura 2) que é composto pela junção dos aminoácidos  $\beta$ -Alanina e L-Histidina, podendo ser encontrado no tecido nervoso, na musculatura esquelética, estômago e outras regiões do corpo de vários mamíferos (DI PAOLA *et al.*, 2011).

Figura 2 - Estrutura da L-Carnosina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

As proteínas possuem uma estrutura mais complexa que os peptídeos, sendo estas compostas pelo entrelaçamento das cadeias peptídicas (QUIROGA, 2014). Estas macromoléculas biológicas desempenham funções vitais nos organismos vivos, sendo constituídas por milhares de aminoácidos que podem possuir cadeias laterais diferentes (NELSON; COX, 2014). De acordo com a diferenciação dessas cadeias laterais de aminoácidos, é possível obter vários produtos de proteínas como por exemplo enzimas, hormônios, fibras musculares e anticorpos (NELSON; COX, 2014).

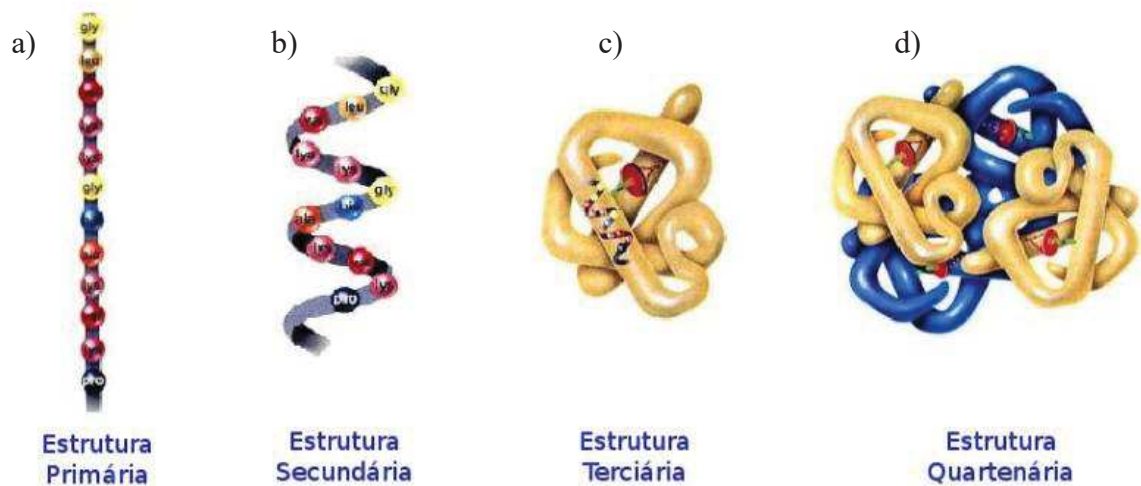
Com base em sua organização estrutural, as proteínas podem ser classificadas de quatro formas:

- a) a estrutura primária se baseia na sequência linear dos aminoácidos ligados entre si através das ligações peptídicas (ROMÃO, 2012) (Figura 3a);
- b) a estrutura secundária é formada quando em alguns pontos da estrutura primária começam a se ligar por ligações de hidrogênio, causando o arranjo do esqueleto

da cadeia polipeptídica no espaço, resultando em conformações nomeadas como  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -pregueada e dobras  $\beta$  (ROMÃO, 2012) (Figura 3b);

- c) a estrutura terciária é formada a partir do arranjo tridimensional da cadeia polipeptídica, ocorrendo ligações entre os aminoácidos mais distantes presentes da própria cadeia resultando em um “dobramento” da cadeia secundária (ROMÃO, 2012) (Figura 3c);
- d) a estrutura quaternária é formada quando ocorre o entrelaçamento do arranjo tridimensional das cadeias polipeptídicas adjacentes (ROMÃO, 2012) (Figura 3d).

Figura 3 - Representação das quatro estruturas das proteínas.



Fonte: Adaptado de (ROMÃO, 2012).

As albuminas são uma classe de proteínas conhecidas por sua grande solubilidade no plasma dos mamíferos, como é o caso da Albumina de Soro Bovino (BSA – do inglês *Bovine Serum Albumin*) (MALASKANI *et al.*, 2017). A BSA é uma proteína presente no sangue bovino, apresentando bastante similaridade estrutural com a albumina de soro humano (HSA – do inglês *Human Serum Albumin*), sendo este o motivo de grande interesse em pesquisas que envolvam essa proteína (HIRAYAMA *et al.*, 1990). A BSA possui peso molecular por volta de 66KDa e é constituída por uma cadeia polipeptídica, podendo sofrer mudanças conformacionais de acordo com a variação de temperatura (LIN *et al.*, 1976) e do pH, sendo carregada negativamente em pH 7 (CARTER; HO, 1994). Sobre a sua composição, a BSA apresenta teores majoritários dos aminoácidos de lisina e ácido glutâmico, por exemplo, além de aromáticos como a tirosina e também aminoácidos que possuem o enxofre em sua

estrutura, como por exemplo, a cisteína (PRATA; SGARBIERI, 2008). Abaixo tem-se a tabela com a composição de todos os aminoácidos presentes na BSA (Tabela 1) (TAVARES, 2020).

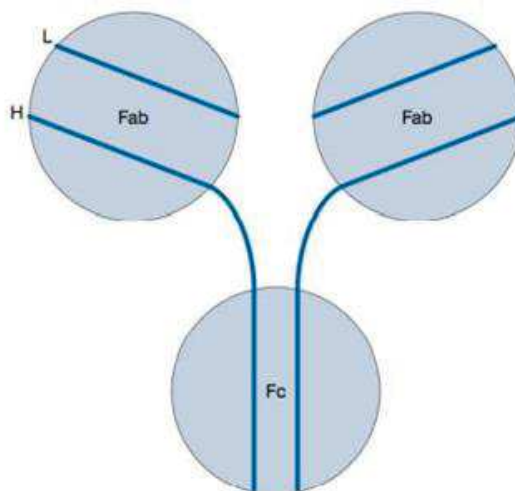
Tabela 1 - Aminoácidos presentes na proteína BSA.

Aminoácidos	Distribuição	Aminoácidos	Distribuição
Alanina	46	Leucina	61
Arginina	23	Lisina	59
Asparagina	14	Metionina	4
Ácido	40	Fenilalanina	27
Aspártico			
Cisteína	35	Prolina	28
Glutamina	20	Serina	28
Ácido	59	Treonina	34
Glutâmico			
Glicina	16	Triptofano	2
Histidina	17	Tirosina	20
Isoleucina	14	Valina	36
Leucina	61	TOTAL	583

Fonte: Adaptado de (TAVARES, 2020).

Outra importante classe de proteínas são os anticorpos, os quais podem ser encontrados em fluidos corporais, possuindo a capacidade de se ligar a antígenos (corpos estranhos) desempenhando a função de evitar as ações prejudiciais dos mesmos nos organismos (SELA-CULANG, 2013). Sobre a sua estrutura, os anticorpos são compostos por duas cadeias, denominadas como leves e pesadas, que são unidas por pontes de dissulfetos, e ainda, possuem uma região flexível de interação entre antígeno-anticorpo (MURRAY *et al.*, 2017). A Figura 4 apresenta a estrutura geral dos anticorpos na qual pode-se observar duas cadeias pesadas “H” e duas cadeias leves “L” e ainda a região denominada “Fab” onde o anticorpo se ligará ao antígeno e outra região “Fc” por onde o anticorpo irá desempenhar algumas funções, como por exemplo, se ligar ao receptor celular (ROITT; DELVES, 2013).

Figura 4 - Estrutura geral dos anticorpos.



Fonte: Adaptado de (ROITT; DELVES, 2013).

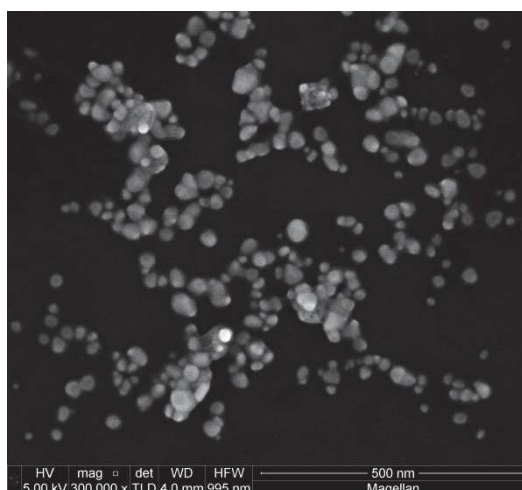
## 1.2 NANOCIÊNCIA – NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PLASMÔNICAS

A nanociência é o ramo que estuda os materiais em escala nanométrica que envolvem diversas áreas como a Engenharia, Química e Biologia (IBRAHIM; UMER; IAQOOB, 2020). Considerada por especialistas como a nova revolução industrial, o uso de nanomateriais está presente cada vez mais em áreas estratégicas, como nos campos energéticos, ambientais, industriais e medicinais (MARTINS *et al.*, 2012). As nanoestruturas são materiais que possuem pelo menos uma de suas dimensões, entre 1 e 100 nm (GORESMAN; FELDMANN, 2010). Em específico, as nanopartículas metálicas (MNPs) de metais nobres como ouro, prata e cobre vêm despertando bastante interesse entre os pesquisadores da área devido as suas propriedades ópticas, magnéticas e catalíticas, que diferem das suas estruturas convencionais macroscópicas (MATSUSHIMA *et al.*, 2012) (WANG *et al.*, 2009).

As nanopartículas de prata (AgNPs) destacam-se entre as MNPs por possuírem uma grande aplicabilidade, principalmente na indústria, como por exemplo no setor alimentício, produtos de limpeza, cosméticos entre outros (DURÁN *et al.*, 2019). Outra característica importante das AgNPs consiste na sua atuação como agente bactericida, sendo esta característica específica desse metal, a qual foi bastante aplicada para o tratamento de queimaduras e doenças causadas por bactérias antes do surgimento dos antibióticos (BRASIL *et al.*, 2018). Além disso, devido as suas propriedades plasmônicas, as AgNPs tem sido utilizada como sensores para a detecção de diversas moléculas. (ZHANG *et al.*, 2009).

Na literatura são reportadas diversas metodologias de síntese de AgNPs, sendo a mais conhecida e reproduzida aquela proposta por Creighton (1979) que utiliza o boroidreto como agente redutor. Outra síntese que deve ser destacada é a proposta por Tsuji *et al.*, (2012) por possuir alguns aspectos interessantes: as AgNPs possuem uma superfície bloqueada, provavelmente por hidroxilas, devido a ação oxidante do peróxido de hidrogênio. Além disso, é possível observar uma variação da coloração das suspensões coloidais com base na ordem da adição dos reagentes, indicando assim a agregação das AgNPs, e conseqüentemente, a relação da coloração da solução com o tamanho das nanopartículas. Essa síntese utiliza o citrato de sódio como agente estabilizante, o peróxido de hidrogênio como agente oxidante e o boroidreto de sódio como agente redutor. O uso do peróxido de hidrogênio junto com o boroidreto de sódio, faz com que ocorra um processo de redução/oxidação que irá ocasionar no crescimento das AgNPs. Essas AgNPs possuem uma morfologia de nanoplanos (Figura 5) como pode ser observado na imagem abaixo, sendo esta medida realizada no Immetro, obtida de síntese semelhante realizada pelo aluno do grupo LabNano, Bruno Guilherme da Fonseca.

Figura 5 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs com morfologia de nanoplanos.



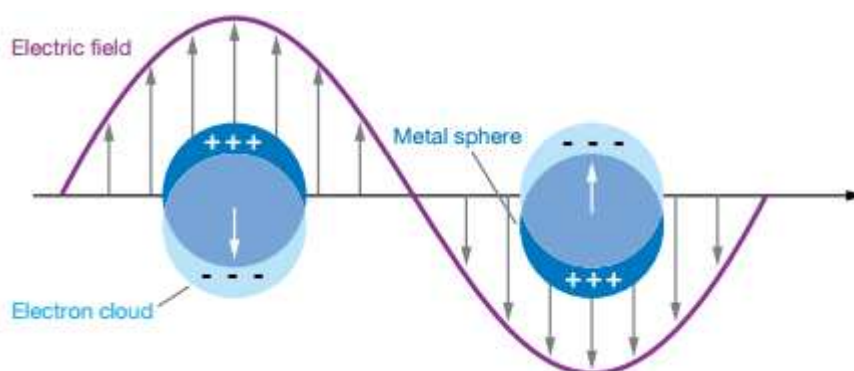
Fonte: LabNano (2014).

As AgNPs possuem propriedades ópticas na região do visível como a ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*). Esse fenômeno consiste na oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução causada pela interação com uma luz incidente promovendo um dipolo induzido oscilante levando a uma intensificação do campo elétrico (KELLY *et al.*, 2013). Na Figura 6 é mostrado a exemplificação da excitação LSPR de uma nanoestrutura de formato esférico (WILLETS;



VAN DUYNE, 2007). No entanto, deve-se ficar claro que essa figura não corresponde com a realidade no sentido das dimensões das nanopartículas quando comparada com o comprimento de onda da radiação incidente. Isso se dá pois as nanopartículas são muito menores do que o comprimento de onda da radiação incidente, com isso, o campo elétrico induzido será homogêneo em toda superfície da nanopartícula.

Figura 6 - Exemplo da oscilação coletiva dos elétrons, no caso, em nanoestruturas esféricas.



Fonte: Adaptado de (WILLETS; VAN DUYNE, 2007).

As AgNPs, bem como as nanopartículas de ouro e de cobre, possuem a frequência do LSPR na região do visível e infravermelho próximo (PEIXOTO *et al.*, 2019). É importante salientar que essa banda de absorção LSPR pode ser “deslocada e ajustada” a partir da variação de alguns fatores, como por exemplo, a morfologia e o tamanho da nanoestrutura (FENG *et al.*, 2020).

### 1.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Na seção seguinte serão discutidas as técnicas analíticas utilizadas para a realização deste trabalho, sendo elas o espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, e das espectroscopias UV-VIS-NIR e Raman, como também do efeito associado a essa última, que é o efeito SERS.

#### 1.3.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica aplicada tanto em pesquisas na academia quanto na indústria, utilizada para mensurar o tamanho das partículas. Essa técnica

se baseia na flutuação das intensidades da luz espalhada pelas partículas presentes nas suspensões, e no caso de amostras diluídas que não interagem entre si em movimento aleatório (Movimento Browniano), torna-se possível obter o raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) (BHATTACHARJEE, 2016). O  $R_H$  representa o tamanho da partícula no formato esférico junto a camadas de solvente e contra-íons, sendo esse termo pertencente a equação Stokes-Einstein (Equação 1). Outros termos dessa equação são:  $K_B$  que é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura,  $n$  é a viscosidade do solvente e  $DT$  que é o coeficiente de difusão translacional da partícula (BHATTACHARJEE, 2016).

$$DT = K_B T / 6\pi n R_H$$

(Equação 1)

O potencial zeta é o potencial elétrico da superfície de uma partícula na presença de um campo elétrico (BHATTACHARJEE, 2016). De acordo com o valor do potencial zeta, se torna possível inferir acerca do grau de repulsão existente entre as partículas carregadas no meio (MAYORAL *et al.*, 2014). Em geral, o potencial zeta diz respeito à estabilidade das partículas.

### 1.3.2 Espectroscopia de absorção no UV-VIS-NIR

A espectroscopia de absorção no UV-VIS-NIR é uma técnica rápida e eficiente que se baseia na interação da luz com as moléculas que constituem a amostra em questão e sua absorção devidas a transições eletrônicas, resultando em um espectro com comprimento de onda variável (BETEMPS *et al.*, 2011). Sua fundamentação se dá a partir da lei de Lambert-Beer, que é a expressão matemática para as medidas de absorção de luz nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho de amostras nos três estados físicos (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). A equação abaixo (Equação 2) representa as medidas de absorção em um dado comprimento de onda, onde os termos são:  $A$  é a absorvância,  $I_0$  a intensidade da radiação monocromática incidente na amostra,  $I$  a intensidade da radiação que emerge da amostra,  $\epsilon$  é a absortividade molar,  $b$  a distância percorrida da luz na amostra e  $c$  é a concentração da espécie absorvente (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon bc$$

(Equação 2)

### 1.3.3 Espectroscopia Raman e Efeito SERS (Espalhamento Raman Intensificado por Superfície)

A espectroscopia Raman é uma técnica consolidada capaz de investigar as estruturas das moléculas através da interação da radiação eletromagnética, proveniente de uma luz monocromática, sob um dado material que irá espalhar essa radiação inelasticamente (SINGH *et al.*, 2015).

Esse fenômeno se baseia no produto da polarizabilidade ( $\alpha$ ) com o campo elétrico (E) da radiação que incide na molécula, que irá resultar na variação do momento de dipolo induzido (P) (SALA, 2008):

$$P = E \cdot \alpha$$

(Equação 3)

Em relação a polarizabilidade, que pode ser entendida como a deformação da nuvem eletrônica na presença de um campo elétrico incidente, essa grandeza pode ser desenvolvida em uma série de Taylor em função da coordenada interna  $q$  (SALA, 2008):

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

(Equação 4)

Ao desconsiderar os termos mais altos, pois a coordenada  $q$  haverá uma pequena variação, considera-se os valores de  $q$  e o campo E como (SALA, 2008):

$$q = q_0 \cos(2\pi V_v t)$$

(Equação 5)

$$E = E_0 \cos(2\pi V_0 t)$$

(Equação 6)

Onde o termo  $V_v$  representa a frequência vibracional e o  $V_0$  a radiação incidente, e substituindo na Equação 3 teremos o valor de momento de dipolo induzido (7) e, após aplicar uma identidade trigonométrica nessa equação tem-se (8) (SALA, 2008):

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi V_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right) q_0 E_0 \cos(2\pi V_0 t) \cos(2\pi V_v t)$$

(Equação 7)

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi V_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right) q_0 E_0 \{ \cos[(2\pi(V_0 + V_v)t)] + \cos[(2\pi(V_0 - V_v)t)] \}$$

(Equação 8)

Se desmembrarmos a equação 8, tem-se que a equação 8.1 é a frequência da radiação incidente referente ao espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico) e a equação 8.2 é referente ao espalhamento Raman Stokes ( $V_0 - V_v$ ) e ao espalhamento Raman Anti-Stokes ( $V_0 + V_v$ ). Com isso, infere-se que somente quando houver variação da polarizabilidade, ou seja,  $\left(\frac{d\alpha}{dq}\right) \neq 0$ , o efeito Raman irá ocorrer (SALA, 2008):

$$\alpha_0 E_0 \cos(2\pi V_0 t)$$

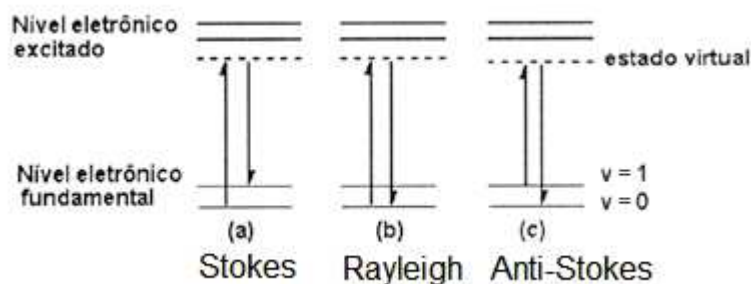
(Equação 8.1)

$$E_0 \{ \cos[(2\pi(V_0 + V_v)t)] + \cos[(2\pi(V_0 - V_v)t)] \}$$

(Equação 8.2)

A Figura 7 ilustra o esquema de espalhamento de luz, onde o espalhamento Stokes (Figura 7a) ocorre quando a frequência de luz incidente é maior que a frequência de luz espalhada, o espalhamento Rayleigh (Figura 7b) ocorre quando a frequência incidente de luz é igual a frequência de luz espalhada e o espalhamento Anti-Stokes (Figura 7c) ocorre quando a frequência de luz incidente é menor que a frequência de luz espalhada pela amostra.

Figura 7 - Ilustração do espalhamento Stokes/Rayleigh/Anti-Stokes.



Fonte: Adaptado de (FARIA *et al.*, 1997).

O uso dessa técnica para análise de proteínas é bastante reportado na literatura. É empregado como modelo o uso da molécula N-metilacetamida como referência para se determinar os modos vibracionais característicos, tanto em peptídeos quanto em proteínas, no que diz respeito a sua estrutura secundária (ANDRUSHCHENKO *et al.*, 2009). Como forma de fornecer informações a respeito das proteínas, existem dois modos vibracionais importantes e característicos de proteínas, que são referentes as bandas de amida I e amida III. (ARÊAS; KAWANO, 1991). Na Tabela 2 tem-se os modos vibracionais das amidas com seus respectivos números de onda e com suas contribuições aproximadas referente a cada ligação química.

Tabela 2 - Modos vibracionais das Amidas.

Modo da Amida	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Contribuições aproximadas individuais aproximadas das ligações químicas (%)
AMIDA I	1700 – 1600	CO $\nu$ (76), CN $\nu$ (11), CCN $\delta$ (8), NH ib (5)
AMIDA II	1570 – 1540	NH ib (45), CN $\nu$ (30), CO ib (10), CC $\nu$ (8), NC $\nu$ (7)
AMIDA III	1250	NH ib (50), CC $\nu$ (20), CN $\nu$ (18), CO ib (12)
AMIDA IV	640-620	CO ib (45), CC $\nu$ (35), CNC $\delta$ (20)

Legenda:  $\nu$  (Estiramento),  $\delta$  (Deformação), ib (Flexão do plano).

Fonte: Adaptado de (TATULIAN, 2013).

Com isso, a partir dessa técnica, é possível obter informações da amostra analisada, sendo esta uma técnica com baixo tempo de análise e de fácil preparo de amostra (SALA, 2008). No entanto, a espectroscopia Raman possui algumas limitações como a baixa seção de choque, que contribui diretamente para as baixas intensidades dos sinais obtidos (SANT'ANA *et al.*, 2006).

Uma forma de contornar esse problema consiste na interação das moléculas em análise com NPs metálicas com propriedades LSPR, levando a uma grande intensificação do sinal Raman, fazendo com que as moléculas adsorvidas nestas superfícies possam ser detectadas em baixas concentrações, sendo este o fenômeno conhecido como Espalhamento Raman Intensificado por superfície (SERS do inglês *Surface-enhanced Raman scattering*) (FARIA *et al.*, 1999) (COSTA *et al.*, 2011). Sobre a intensificação do sinal Raman, é possível afirmar que este varia entre  $10^6$  e  $10^{10}$  vezes (AROCA, 2006). Além da intensificação nas superfícies, é possível que a molécula adsorvida esteja entre duas nanopartículas metálicas “hot spots”, fazendo assim com que a intensificação do sinal Raman seja na ordem de  $10^{11}$  (SANT'ANA *et al.*, 2006).

Esse efeito pode ser explicado a partir de dois modelos, o modelo eletromagnético e o modelo químico.

O modelo Eletromagnético se baseia na intensificação do campo elétrico local da superfície das nanoestruturas metálicas (Figura 6), o qual irá conseqüentemente, intensificar o sinal Raman das moléculas que estejam adsorvidas ou que estejam muito próximas das superfícies rugosas do metal, fazendo com que o espectro SERS e o espectro Raman das moléculas sejam os mesmos (SANT'ANA *et al.*, 2006) (MCNAY *et al.*, 2011). É importante ressaltar que essa teoria vem sofrendo grandes avanços, com a motivação de se criarem cada vez mais substratos SERS de alto desempenho, para as mais diversas aplicações (DING *et al.*, 2017). Já o modelo químico se baseia na ligação metal-molécula, ou seja, ocorre a adsorção da molécula de interesse na superfície do metal, formando assim o chamado “complexo de superfície”, resultando no espectro SERS da molécula, podendo haver pequenos deslocamentos das bandas quando comparado com o espectro Raman da mesma (SANT'ANA *et al.*, 2006) (MCNAY *et al.*, 2011). Normalmente o espectro SERS envolve a mistura desses dois efeitos.

Essa intensificação do campo elétrico pode ser explicitada pela fórmula abaixo (KNEIPP *et al.*, 1999), onde  $I_{\text{SERS(VS)}}$  é a intensidade do sinal SERS,  $I_{\text{(VL)}}$  é a intensidade da radiação excitante,  $A_{\text{(VL)}}$  é o campo elétrico da radiação incidente,  $A_{\text{(VS)}}$  é o campo elétrico da

radiação espalhada,  $N$  é o número de moléculas envolvidas e  $\sigma_{\text{ads}}^{\text{R}}$  é a secção de choque Raman da molécula adsorvida:

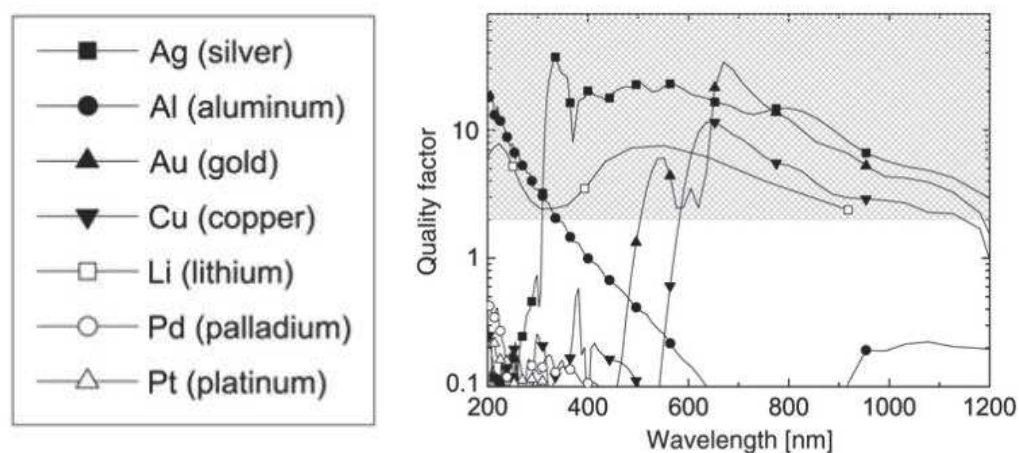
$$I_{\text{SERS(VS)}} = N \cdot I_{\text{(VL)}} \cdot |A_{\text{(VL)}}|^2 \cdot |A_{\text{(VS)}}|^2 \cdot \sigma_{\text{ads}}^{\text{R}}$$

(Equação 9)

Para compreender melhor o que ocorre na superfície metálica quando aplicado um campo elétrico, é necessário aplicar um modelo simples, como o Modelo de Drude, que após aplicá-lo no caso dos plásmons tem-se a função dielétrica do metal, que irá possuir uma parte “Real” e outra “Imaginária”, sendo a primeira referente ao espalhamento de luz, enquanto a segunda diz respeito a absorção da luz (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Diversas pesquisas sobre a incorporação de nanopartículas em substratos vem despertando bastante interesse por grupos de pesquisas para serem utilizados na detecção de moléculas através da espectroscopia SERS (WANG *et al.*, 2006). Para que um substrato SERS apresente um bom desempenho, a parte “Imaginária” da função dielétrica deve ser mínima, enquanto a parte “Real” deve ser negativa e, além disso, essas duas partes podem ser relacionadas entre si, através do conceito do fator de qualidade (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

O fator de qualidade indica em qual região espectral cada metal possa ser aplicado de melhor forma com o objetivo de se obter espectros SERS, como demonstrado na Figura 8 (LE RU; ETCHEGOIN, 2009). Na figura abaixo pode-se observar uma região “sombreada” no gráfico indicando quais metais são adequados para aquisição dos espectros SERS, sendo esta região referente a valores de fator de qualidade maiores ou igual a dois.

Figura 8 - Fator de qualidade para diferentes metais na região espectral do visível e infravermelho próximo.



Fonte: Adaptado de (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

Sobre o uso e aplicação dessas nanopartículas metálicas, de acordo com a literatura, é possível observar vários trabalhos que abordam a incorporação das mesmas em substratos para a construção de superfícies nanoestruturadas, que podem ser aplicadas, tanto para o desenvolvimento de pesquisas quanto no setor industrial (WANG *et al.*, 2006). Sobre a construção dessas superfícies contendo nanopartículas, é importante destacar a vantagem que estes podem ser armazenados sem que sua estrutura morfológica sofra mudanças (SCHNEID *et al.*, 2015), no entanto, um grande desafio é torná-los estáveis e também reprodutíveis (HUH, 2010).

No caso da interação de biomoléculas com as superfícies metálicas, deve-se levar em consideração as possíveis mudanças conformacionais dessas moléculas (KENEGNE-MOMO *et al.*, 2012). De acordo com a literatura, muitos trabalhos indicam que é possível obter espectros SERS de proteínas. Muitos desses trabalhos envolvem a proteína BSA, seja para o desenvolvimento de um estudo sobre a interação de nanopartículas de ouro com a BSA (CAO *et al.*, 2012), na construção de um sensor SERS para detecção de biomoléculas em soluções líquidas de aminoácidos (lisozima e fenilalanina) e proteínas (BSA) em concentrações baixas (FAZIO *et al.*, 2016) e também para a construção de filmes nanoestruturados sobre superfícies não porosas como substrato contendo AuNPs modificadas por vários tipos de mercaptanas para adsorção de BSA, verificando a reprodutibilidade espectral devida às interações AuNP-mercaptana-BSA (NOMAN; SANT'ANA, 2018).

Sobre esse último trabalho, o uso das mercaptanas levou a um tipo predominante de geometria de adsorção da proteína sobre a superfície nanoestruturada de ouro, e em



consequência disso, acarretou numa grande reprodutibilidade espectral, fato importante que influenciou para a realização deste trabalho.

Desta forma, neste trabalho foram construídas superfícies nanoestruturadas contendo nanopartículas de prata, utilizando ou não a mercaptana 2-Mercaptoetanol (ME), a fim de se adsorver proteínas com o objetivo de se investigar a forma de como essas biomoléculas são adsorvidas em superfícies metálicas.

## 2 OBJETIVOS

Estudar a interação das moléculas do aminoácido L-Metionina, do dipeptídeo L-Carnosina e também das proteínas BSA e os anticorpos anti-Albumina de Soro Bovino (Anti-BSA) e anti-receptor de folato (Anti-FOL), adsorvidas em superfícies nanoestruturadas de AgNPs com presença e ausência do modificador de superfície ME, por espectroscopia SERS.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentre os objetivos específicos do trabalho, estão:

- a) sintetizar as AgNPs e realizar a sua caracterização espectroscópica por absorção no UV-VIS-NIR;
- b) determinar a distribuição de tamanhos das AgNPs pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e de carga superficial por potencial zeta;
- c) construir as superfícies nanoestruturadas de AgNPs sobre lâminas de vidro;
- d) obter os espectros Raman das moléculas cristal violeta (CV), da L-Metionina (MET), da L-Carnosina (CAR), da BSA e do anticorpo Anti-FOL;
- e) caracterizar por espectroscopia SERS a adsorção do CV, da MET, da CAR, do ME, da BSA e dos anticorpos Anti-BSA e Anti-FOL em superfícies nanoestruturadas de AgNPs;
- f) caracterizar por espectroscopia SERS a adsorção da BSA e dos anticorpos Anti-BSA e Anti-FOL em superfícies nanoestruturadas construídas a partir das AgNPs, modificados por ME.

### 3 METODOLOGIA

Abaixo será apresentada a metodologia aplicada para a realização deste trabalho, sendo dividida nas seguintes etapas: Instrumentação, Mapeamentos SERS e condições das medidas, Reagentes e Solventes, Síntese das AgNPs e Construção das superfícies nanoestruturadas.

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Nessa seção serão apresentadas a instrumentação utilizada para a realização deste trabalho, como é o caso do Espectrômetro de absorção UV-VIS-NIR, Espectrômetro Raman, DLS e Potencial Zeta.

##### 3.1.1 Espectrômetro de absorção UV-VIS-NIR

A solução coloidal de AgNPs foi analisada utilizando um espectrofotômetro Ocean optics fiber USB 2000 + XRI-ES, NIR 256-2.1 na faixa de 200 a 2800 nm, utilizando cubetas de quartzo de caminho ótico 5 mm.

##### 3.1.2 DLS e Potencial Zeta

A solução coloidal foi analisada pelo equipamento de espalhamento de luz dinâmico (DLS) Marlvern, Nano ZS90 (Red badge) e model number (ZEN3690) particle size and zeta potencial - 90° optics. O DLS determina o raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) das partículas através do espalhamento de luz a partir do movimento Browniano das partículas presentes na solução. Assim, é possível obter informações acerca da distribuição dos tamanhos das partículas analisadas.

No mesmo equipamento é possível determinar a carga da superfície das nanopartículas, por meio do potencial Zeta, que irá indicar a carga elétrica que recobre a nanopartícula dando a informação sobre a estabilidade da solução coloidal.

### 3.1.3 Espectrômetro Raman

O espectro Raman da molécula de BSA no estado sólido foi obtido no espectrômetro FT-Raman Bruker-RFS-100, equipado com um detector de germânio refrigerado por nitrogênio líquido, acoplado a um microscópio Olympus com uma lente objetiva de magnificação de longo alcance de 40 vezes com linha de excitação do laser Nd-YAG com comprimento de onda de 1064 nm.

Os espectros Raman das moléculas, MET e CAR no estado sólido e da solução de Anti-FOL seca sobre placa de vidro, além dos espectros SERS (MET, CAR, ME, BSA, Anti-BSA e Anti-FOL) foram obtidos no espectrômetro Raman Bruker-Senterra dispersivo equipado com um detector CCD refrigerado termoeletricamente, acoplado a um microscópio Olympus com uma lente objetiva de magnificação de curto alcance de 100 vezes, com linha do laser de excitação com comprimento de onda de 632,8 nm. Apenas para o CV foram obtidos os espectros Raman e SERS com as radiações excitantes de comprimento de onda 632,8 e 785 nm.

## 3.2 MAPEAMENTOS SERS, CONDIÇÕES DE MEDIDAS E A RELAÇÃO DA POTÊNCIA NOMINAL E POTÊNCIA REAL

Para a realização das medidas, foram realizados mapeamentos como forma de estudar a maneira da adsorção dos analitos na superfície de prata, como também a reprodutibilidade espectral. Com isso, numa dada região da superfície nanoestruturada, foi selecionada uma matriz retangular de pontos com distância entre si de 5 micrômetros, onde cada ponto selecionado resultou em um espectro. Todos os espectros foram plotados utilizando o software Origin 8, inclusive os ajustes de correção de linha base e o uso da ferramenta *smooth*. Sobre a seleção dos espectros nos mapeamentos SERS para uma posterior tentativa de atribuição de bandas, estes foram selecionados a partir da comparação com resultados similares presentes na literatura, de acordo com os padrões espectrais referentes aos adsorbatos utilizados para a realização deste trabalho, além da reprodução do mesmo padrão espectral entre os vários pontos selecionados.

Exceto o espectro Raman do sólido da BSA, os outros espectros Raman e SERS foram obtidos no equipamento espectrômetro Raman Bruker-Senterra dispersivo e apresentaram a potência nominal (que é aquela escolhida no software no momento da realização da medida) diferente da potência real (que é a potência que realmente é incidida na amostra). Isso foi

observado através de um medidor de potência, com isso, abaixo é possível observar na tabela 3 as condições de medidas realizadas dos espectros/mapeamentos SERS realizados e na tabela 4 as condições de medidas para os espectros Raman.

Tabela 3 - Condições de medidas dos espectros/mapeamentos SERS das moléculas.

Filmes	Linha Laser (nm)	Potência (Nominal/ Real) mW	Tempo de Acumulação	Abertura da Fenda
Ag-CV	785	100/70	10 s	2 mm
Ag-CV	632,8	10 /5	10 s	2 mm
Ag-MET	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-CAR	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-ME	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-BSA	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-ME-BSA <sup>X</sup>	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-AntiBSA	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-ME-AntiBSA	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-AntiFOL	632,8	2/1	15 s	50x1000 $\mu$ m
Ag-ME-AntiFOL	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-ME-BSA <sup>Y</sup>	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-ME-BSA <sup>Z</sup>	632,8	2/1	15 s	2 mm
Ag-ME-BSA <sup>X1</sup>	632,8	10/5	15 s	2 mm
Ag-ME-BSA <sup>X2</sup>	632,8	20/10	15 s	2 mm

Legenda: c (coadições), s (segundos), mm (milímetros),  $\mu$ m (micrometros), Ag-ME-BSA<sup>X</sup> (filme construído utilizando a síntese avermelhada), Ag-ME-BSA<sup>Y</sup> (filme construído utilizando a síntese alaranjada), Ag-ME-BSA<sup>Z</sup> (filme construído utilizando a síntese arroxeadada), Ag-ME-BSA<sup>X1</sup> (filme construído utilizando a síntese avermelhada aplicando uma potência nominal de 10 mW) e Ag-ME-BSA<sup>X2</sup> (filme construído utilizando a síntese avermelhada aplicando uma potência nominal de 20 mW). Todos os espectros foram coletados utilizando-se objetiva de magnificação 100 vezes.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 4 - Condições de medidas dos espectros Raman das moléculas.

Sólido seco	Linha Laser (nm)	Potência (Nominal/ Real) mW	Tempo de Acumulação	Abertura da Fenda
CV	632,8	2/1	15 s	2 mm
MET	632,8	2/1	15 s	25x1000 $\mu\text{m}$
CAR	632,8	20/10	15 s	2 mm
BSA	1064	250	512 scans	-
Anti-FOL	632,8	5/2,5	15 s	50x1000 $\mu\text{m}$

Legenda: c (coadições), s (segundos), mm (milímetros),  $\mu\text{m}$  (micrometro).

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

### 3.3 REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes utilizados foram: Nitrato de prata (Sigma-Aldrich), Citrato de sódio (Sigma-Aldrich), Boroidreto de sódio (Fluka), Peróxido de Hidrogênio 30% v/v (Vetec), 2-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), Cristal Violeta (Vetec), Albumina de Soro Bovino (Sigma-Aldrich), L-Metionina (Sigma-Aldrich), L-Carnosina (Sigma-Aldrich), anti-Albumina de Soro Bovino (Sigma Aldrich) e anti-receptor de folato (Sigma Aldrich).

Os reagentes utilizados foram: Álcool Etilico (Synth), Ácido Nítrico (Synth), Ácido Clorídrico (Sciavico) e Água deionizada do deionizador Milipore Synergy-UV ( $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ).

### 3.4 SÍNTESE DAS AgNPs DISPERSAS EM MEIO AQUOSO

Para o preparo do coloide de Ag, baseado na síntese de Tsuji *et al.*, (2012), foram adicionados 50 mL de uma solução de  $\text{AgNO}_3$  ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e 3 mL de uma solução aquosa de citrato de sódio ( $30 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em um erlenmeyer, que foi mantido sob agitação. Posteriormente foram adicionados 280  $\mu\text{L}$  de boroidreto de sódio ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na solução do erlenmeyer e assim foi possível observar a coloração da solução variando de incolor para amarelada.

Em seguida, essa solução foi levada para o banho ultratermostático de modo que a temperatura fosse constante em 27°C com variações menores que 0,2°C. Após 30 minutos, foram adicionados 120 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% m/v) de forma rápida e assim, sob agitação, foi possível observar a mudança da coloração de amarelo pálido para laranja até chegar no vermelho. Por fim, o erlenmeyer foi levado novamente ao banho ultratermostático, durante 1 hora.

### 3.5 CONSTRUÇÃO DAS SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS DE PRATA

Para que se pudesse obter as superfícies contendo AgNPs, foi adaptado o procedimento descrito na literatura por Noman e Sant'Ana (2018).

#### 3.5.1 Limpeza das lâminas de vidro

As lâminas de vidro foram imersas em uma solução de água régia (HCl/HNO<sub>3</sub> 3:1) por 5 minutos, com a finalidade de retirar possíveis metais pesados presentes na lâmina. Após esse intervalo de tempo, as lâminas foram retiradas dessa solução e foram lavadas excessivamente com água deionizada. Por fim, estas foram secas na estufa.

#### 3.5.2 Preparo das suspensões de AgNPs

Por causa da superfície impedida por causa do excesso de cargas OH<sup>-</sup> das AgNPs, se fez necessário à sua ressuspensão em meio aquoso, com a objetivo de retirar o excesso dessas cargas, com isso, as AgNPs foram levadas à centrifugação por 10 minutos com valor de força g de 15339 m/s<sup>2</sup>. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante. e o precipitado foi ressuspendido em água deionizada.

#### 3.5.3 Obtenção das superfícies nanoestruturadas de prata

Nessa seção serão apresentadas a forma de como foram obtidas as superfícies nanoestruturadas de prata, de acordo com o método 1 e método 2.

### 3.5.3.1 Obtenção das superfícies nanoestruturadas de prata – Método 1

Todos as superfícies nanoestruturadas foram construídas da mesma forma, ou seja, foi preparada uma solução aquosa do analito e dessa solução foram retirados 100  $\mu\text{L}^{-1}$  para em seguida, misturá-la com 900  $\mu\text{L}^{-1}$  de a solução do coloide ressuspendido obtida no item 3.5.2. Essa solução foi deixada em repouso por 1 hora sob a bancada.

Sob as lâminas secas, foi gotejado a solução contendo o coloide ressuspendido com o analito, e posteriormente, essa lâmina foi seca à vácuo em uma temperatura de 30°C por 10 minutos. Em seguida, a lâmina foi levada para análise no espectrômetro Raman. Foram preparadas as seguintes superfícies nanoestruturadas:

Tabela 5 - Superfícies nanoestruturadas construídas.

Filme	Composição	Concentração final do analito
1	Ag-CV	[CV] = $1,0 \times 10^{-6}$ mol. $\text{L}^{-1}$
2	Ag-MET	[MET] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol. $\text{L}^{-1}$
3	Ag-CAR	[CAR] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol. $\text{L}^{-1}$
4	Ag-BSA	[BSA] = $1,0 \times 10^{-8}$ mol. $\text{L}^{-1}$
5	Ag- Anti-BSA	[Anti-BSA] = 0,05 mg. $\text{mL}^{-1}$
6	Ag- Anti-FOL	[Anti-FOL) = $1,0 \times 10^{-9}$ mol. $\text{L}^{-1}$

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

### 3.5.3.2 Obtenção das superfícies nanoestruturadas de prata – Método 2

Primeiramente foi preparado uma solução do ME em meio etanoico, com concentração final de  $1,0 \times 10^{-6}$  mol  $\text{L}^{-1}$ . Dessa solução, foi retirada uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  a qual foi misturada com 900  $\mu\text{l}$  de solução coloidal ressuspendida, obtida no item 3.5.2., sendo mantida em repouso por 15 minutos sob a bancada, resultando em uma concentração final de ME de  $1,0 \times 10^{-7}$  mol  $\text{L}^{-1}$ . Todos as superfícies nanoestruturadas nessa seção foram construídos utilizando a essa concentração do ME.

Posterior a isso, foram construídas as seguintes superfícies nanoestruturadas:



Tabela 6 - Superfícies nanoestruturadas construídas na presença do ME.

Filme	Composição	Concentração final do analito
1	Ag-ME	[ME] = $1,0 \times 10^{-7}$ mol. L <sup>-1</sup>
2	Ag-ME-BSA <sup>X</sup>	[BSA] = $1,0 \times 10^{-8}$ mol. L <sup>-1</sup>
3	Ag- ME- Anti-BSA	[Anti-BSA] = 0,05 mg. mL <sup>-1</sup>
4	Ag- ME- Anti-FOL	[Anti-FOL) = $1,5 \times 10^{-7}$ mol. L <sup>-1</sup>
5	Ag-ME-BSA <sup>Y</sup>	[BSA] = $1,0 \times 10^{-8}$ mol. L <sup>-1</sup>
6	Ag-ME-BSA <sup>Z</sup>	[BSA] = $1,0 \times 10^{-8}$ mol. L <sup>-1</sup>

Legenda: Ag-ME-BSA<sup>X</sup> (superfície nanoestruturada construída utilizando a síntese avermelhada), Ag-ME-BSA<sup>Y</sup> (superfície nanoestruturada construída utilizando a síntese alaranjada), Ag-ME-BSA<sup>Z</sup> (superfície nanoestruturada construída utilizando a síntese arroxeadada).

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Todos as superfícies nanoestruturadas foram construídas da mesma forma, ou seja, foi preparada uma solução aquosa do analito e, dessa solução, foram retirados 100 µl para em seguida, misturá-la com 900 µl de uma solução contendo o coloide ressuspendido com ME. Essa solução foi deixada em repouso por 1 hora sob a bancada.

Sob as lâminas secas, foi gotejada a solução contendo o coloide ressuspendido com o analito, e posteriormente, essa lâmina foi seca à vácuo em uma temperatura de 30°C por 10 minutos. Em seguida, a lâmina foi levada para análise no espectrômetro Raman.

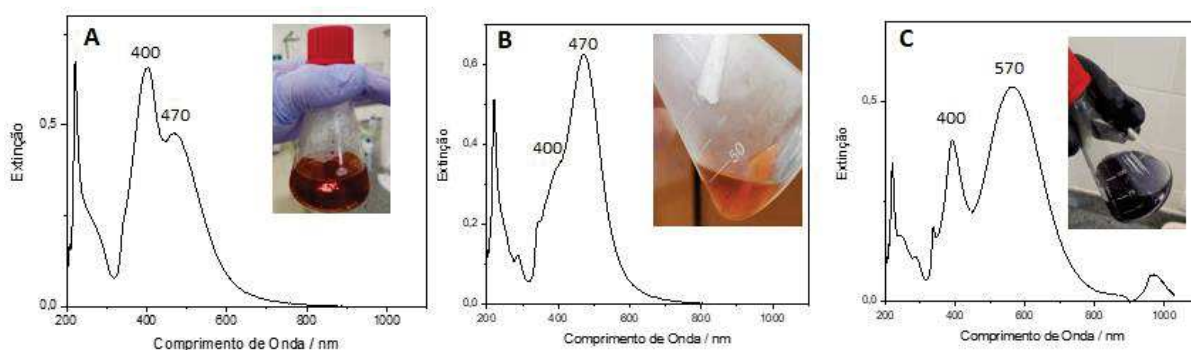
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão discutidos os resultados obtidos acerca da síntese realizada, os espectros Raman dos adsorbatos CV, MET, CAR, BSA, ANTI-BSA E ANTI-FOL como também dos espectros SERS dos adsorbatos adsorvidos nas superfícies nanoestruturadas.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA SÍNTESE DE AgNPs

Na síntese de Tsuji *et.al* (2012), ao alterar a forma de se adicionar os seus reagentes, se torna possível obter diferentes tamanhos de AgNPs e, em consequência disso, diferentes colorações dessa síntese. Foram preparadas três sínteses que resultaram colorações diferentes: alaranjada, avermelhada e arroxeadada. A diferença entre elas foram, na síntese avermelhada, depois de deixar estabilizá-la no banho ultratermostático por 30 minutos, o erlenmeyer foi retirado do banho para que fosse adicionado de maneira rápida o peróxido de hidrogênio, e assim fosse agitado manualmente até que a coloração da síntese passasse de amarelo pálido, laranja e chegasse na coloração avermelhada. Após isso, o erlenmeyer foi colocado novamente no banho, onde foi mantido por 1 hora. A segunda síntese, de coloração alaranjada, também foi realizada da mesma forma, porém ao adicionar o peróxido de hidrogênio de forma rápida, o erlenmeyer foi agitado manualmente até que a coloração fosse alaranjada fosse alcançada, e assim, foi colocado em cima da bancada, não retornando ao banho termostático. A terceira síntese de cor arroxeadada também seguiu o mesmo procedimento, mas após a adição do peróxido rápida, foi agitado até a coloração arroxeadada e, por fim, o erlenmeyer foi colocado em cima da bancada, não retornando ao banho termostático. Abaixo, é possível observar os espectros UV-VIS-NIR e suas respectivas colorações resultantes, avermelhada (Figura 9A), alaranjada (Figura 9B) e arroxeadada (Figura 9C). Como já haviam sido realizados alguns testes prévios com a síntese de coloração avermelhada, para a realização deste trabalho essa síntese foi escolhida (Figura 9A).

Figura 9 - Espectro UV-VIS-NIR da suspensão coloidal avermelhada (A), alaranjada (B) e arroxeada (C).

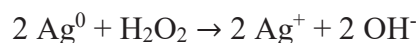


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Ao comparar os três espectros, nota-se que, o espectro referente a síntese das AgNPs avermelhadas (Figura 9A) possui um tamanho predominante de partículas menores, quando comparados com as outras sínteses. A banda com máximo em *ca.* 400 nm, refere-se a nanopartículas com tamanho por volta de 20 nm, e ao observar essa mesma banda nos outros espectros, ela tende a diminuir. Já a banda em 470 nm tende a se deslocar para maiores comprimentos de onda, indicando assim uma distribuição de tamanhos maiores de nanopartículas presentes nas sínteses. Esse processo contínuo de redução seguida por oxidação permite que essas partículas maiores sejam reconstruídas, resultando nos nanoplates. Este foi um resultado diferente do que reportado por Tsuji *et al.*, (2012), no entanto, já era esperado essa diferença pois a forma de como adicionar alguns reagentes não foi a mesma. Em consequência disso, a distribuição de tamanhos também não foi a mesma reportada no artigo. De acordo com a síntese reportada, ao adicionar o boroidreto de sódio e o peróxido de hidrogênio, de forma lenta sob agitação, o resultado seria uma coloração do coloide azulada. No caso dessa síntese, o boroidreto de sódio foi adicionado de forma lenta e o peróxido de hidrogênio foi adicionado de forma rápida e, em seguida, o erlenmeyer foi agitado até o momento em que a coloração se mostrou com coloração avermelhada.

Ao analisar esse espectro (Figura 10A), é possível inferir que a suspensão coloidal possui duas distribuições de tamanho, bem próximas, de nanopartículas referentes as duas bandas citadas. Para a adsorção dos analitos, foi realizada a centrifugação / ressuspensão em meio aquoso, pelo fato da superfície das AgNPs ser impedida por causa do excesso de cargas  $\text{OH}^-$ , como pode ser demonstrada na reação abaixo (Reação 1), que provavelmente é a razão que impediu a adsorção dos analitos de interesse. Após a centrifugação, e em seguida

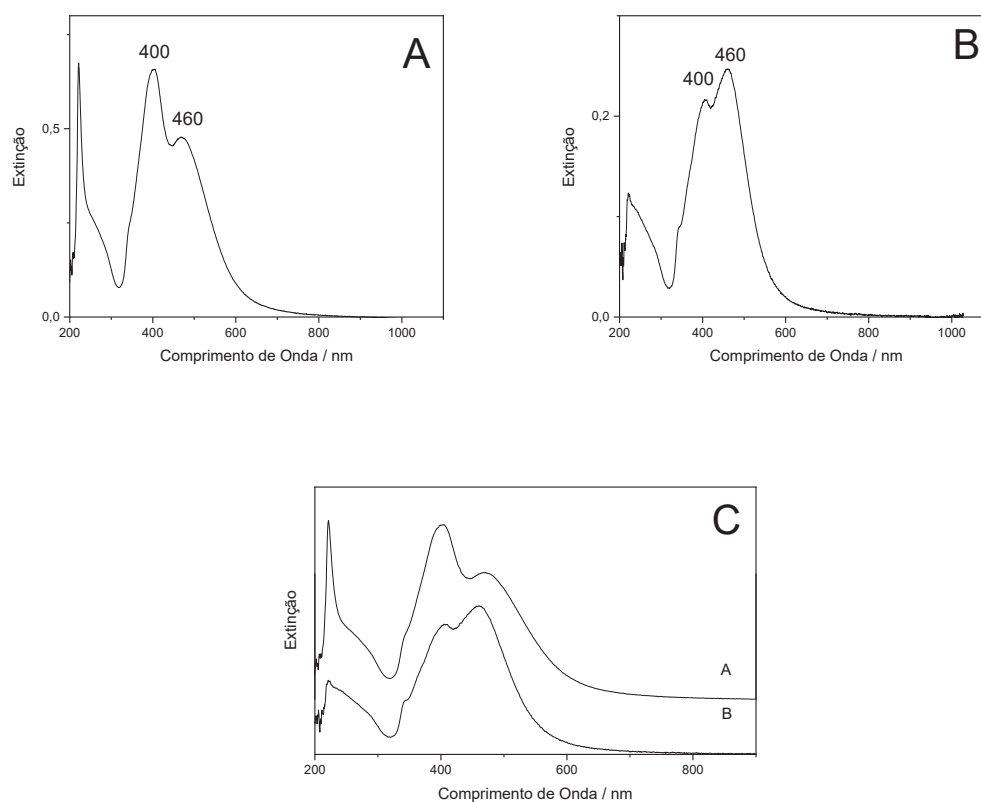
ressuspensão em meio aquoso, foi medido o espectro UV-VIS-NIR da suspensão coloidal (Figura 10B).



(Reação 1)

Ao analisar esse espectro (Figura 10B), foi possível observar as duas bandas já observadas no espectro anterior (Figura 10A), porém notou-se uma diferença no valor da extinção dessas bandas. No primeiro espectro, a banda mais próxima da região UV era mais intensa, o que significa que antes da centrifugação/ressuspensão a maioria das AgNPs presentes na suspensão faziam parte de uma distribuição de menor tamanho, quando comparados a outra banda indicada. Após a centrifugação/ressuspensão, as intensidades dessas bandas diminuíram, a ponto da banda mais próxima da região do IV se tornou mais intensa, o que de fato já era esperado, pois depois da centrifugação, as nanopartículas de tamanhos maiores foram para o fundo do ependorff e em seguida com a ressuspensão, em meio aquoso, as menores foram para o sobrenadante. Como esse sobrenadante é descartado, era esperado que as AgNPs com tamanhos maiores prevalecessem, e isso é constatado no espectro após a centrifugação. Ao comparar os dois espectros UV-VIS-NIR, se torna melhor a visualização dessa diferença (Figura 10C).

Figura 10 - Espectros UV-VIS-NIR das suspensões AgNPs antes da centrifugação (A), após a centrifugação e ressuspensão (B) e os mesmos espectros plotados junto (C).

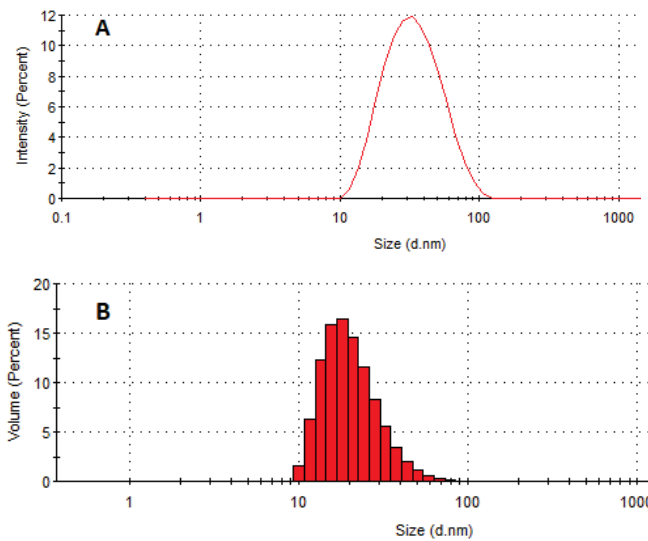


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A análise do DLS avaliou o tamanho das nanopartículas na solução aquosa, antes e depois da centrifugação/ ressuspensão em meio aquoso. Logo após a realização da síntese, foi medido o DLS da mesma, indicado num gráfico de tamanho por intensidade (Figura 11A), logo, a partir desse resultado, foi possível constatar a presença de populações de nanopartículas muito próximas. Outro gráfico interessante, a respeito dessa mesma medida foi obtido, que é o caso de tamanho por volume (Figura 11B) que resultou num tamanho médio de 21,37 nm. Foi também analisada a medida do DLS após a centrifugação da síntese e sua ressuspensão em meio aquoso, demonstrado nos gráficos de tamanho por intensidade (Figura 12A) e tamanho por volume (Figura 12B), no qual resultou num tamanho médio de 24,64 nm. Esse resultado é interessante pois pode-se notar que a partir da ressuspensão do precipitado, que continha as nanopartículas de tamanhos maiores, e o descarte do sobrenadante que continha as nanopartículas de tamanho menores, que não respondem à centrifugação, notou-se que a curva após a ressuspensão ficou mais intensa e a distribuição de tamanhos se tornou mais homogênea, restando assim as AgNPs com maior distribuição de tamanho. Outro fato

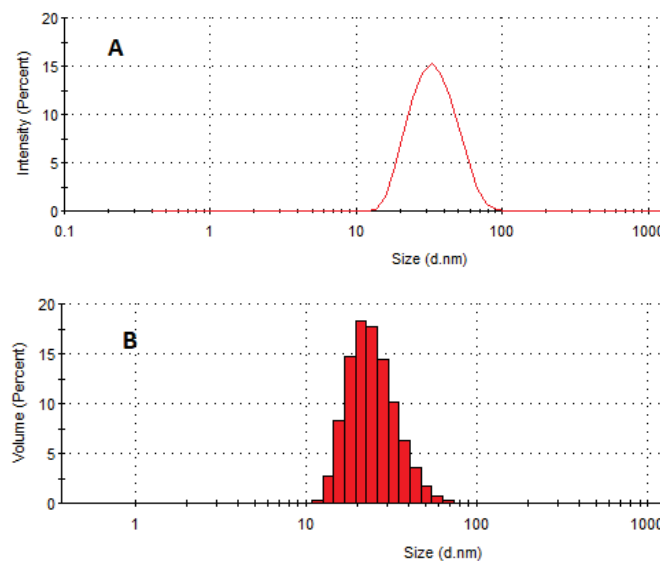
importante foi que, após a ressuspensão, as AgNPs de maiores tamanhos com *ca.* 100 nm também não prevaleceram, isso pode ser explicado pois, utilizando um ependorff para a centrifugação, muitas dessas nanopartícula ficam presas na parede do próprio ependorff, o que pode ser observado visualmente.

Figura 11 - Resultado da análise do DLS da suspensão aquosa de AgNPs tamanho por intensidade (A) e tamanho por volume (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

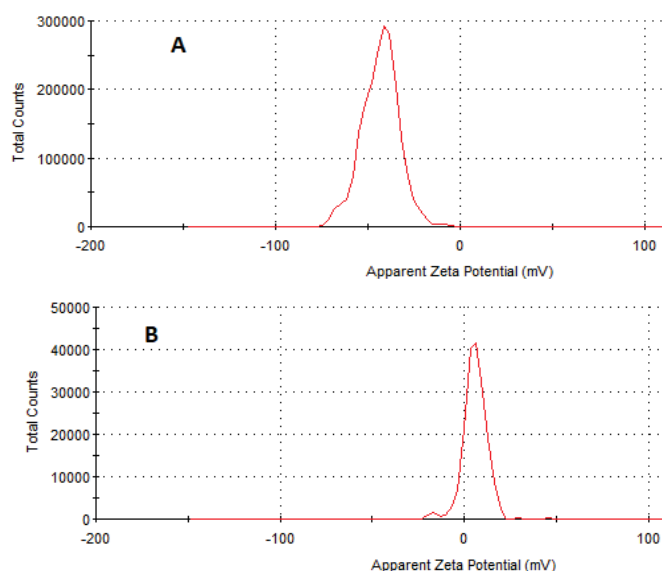
Figura 12 - Resultado da análise do DLS da suspensão aquosa de AgNPs após a ressuspensão em meio aquoso tamanho por intensidade (A) e tamanho por volume (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Os valores obtidos através da análise do potencial Zeta (Figura 13A) resultaram no valor de  $-43,1$  mV, indicando assim que a superfície das AgNPs está carregada negativamente, muito provavelmente por causa dos reagentes utilizados para a realização da síntese. O boroidreto de sódio que foi o agente redutor gerou íons boratos na superfície das AgNPs, o peróxido de hidrogênio que foi o agente oxidante gerou íons  $\text{OH}^-$  e, por fim, o citrato de sódio que atua como agente estabilizador gerou uma carga na superfície que é negativa. Após a centrifugação e ressuspensão em meio aquoso, foi medido o potencial zeta que resultou num valor de  $+5,94$  mV (Figura 13B), isso pode ser explicado pois após a ressuspensão, as cargas negativas que estabilizavam as AgNPs que impediam a aproximação dos analitos na superfície, o que motivou a centrifugação do coloide e, em seguida, sua ressuspensão em meio aquoso, ( $\text{OH}^-$ , íons borato e íons citrato) são retiradas resultando numa carga positiva na superfície das nanopartículas, e pelo valor resultante conclui-se que essas AgNPs não são mais estáveis, de forma que foi decidido que todo procedimento experimental para a obtenção dos espectros SERS foi realizado no mesmo dia da centrifugação.

Figura 13 - Análise do potencial Zeta da suspensão aquosa de AgNPs antes da centrifugação (A) e após a centrifugação/ressuspensão em meio aquoso (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

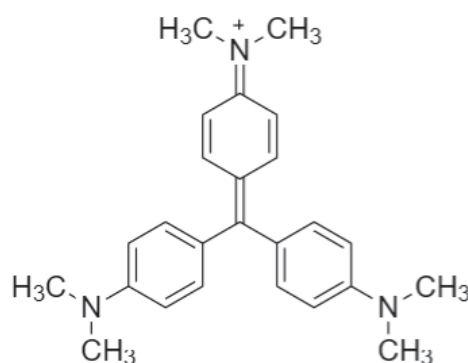
## 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SERS DAS SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS DE Ag (AGNS)

Nessa seção serão apresentados os resultados obtidos acerca da atividade SERS das superfícies nanoestruturadas de prata construídas.

### 4.2.1 Caracterização Raman e SERS utilizando o CV como molécula de prova

Após a síntese das AgNPs, iniciou-se o processo para obtenção das superfícies nanoestruturadas descritos no item 3.5.3. As superfícies nanoestruturadas foram obtidas após gotejamentos em lâminas de vidros previamente limpas, e secas a vácuo em uma temperatura de 30°C por 10 minutos. Com a finalidade de avaliar a atividade SERS do substrato (superfícies nanoestruturadas), foi utilizado o CV (Figura 14) como analito.

Figura 14 - Estrutura do CV.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

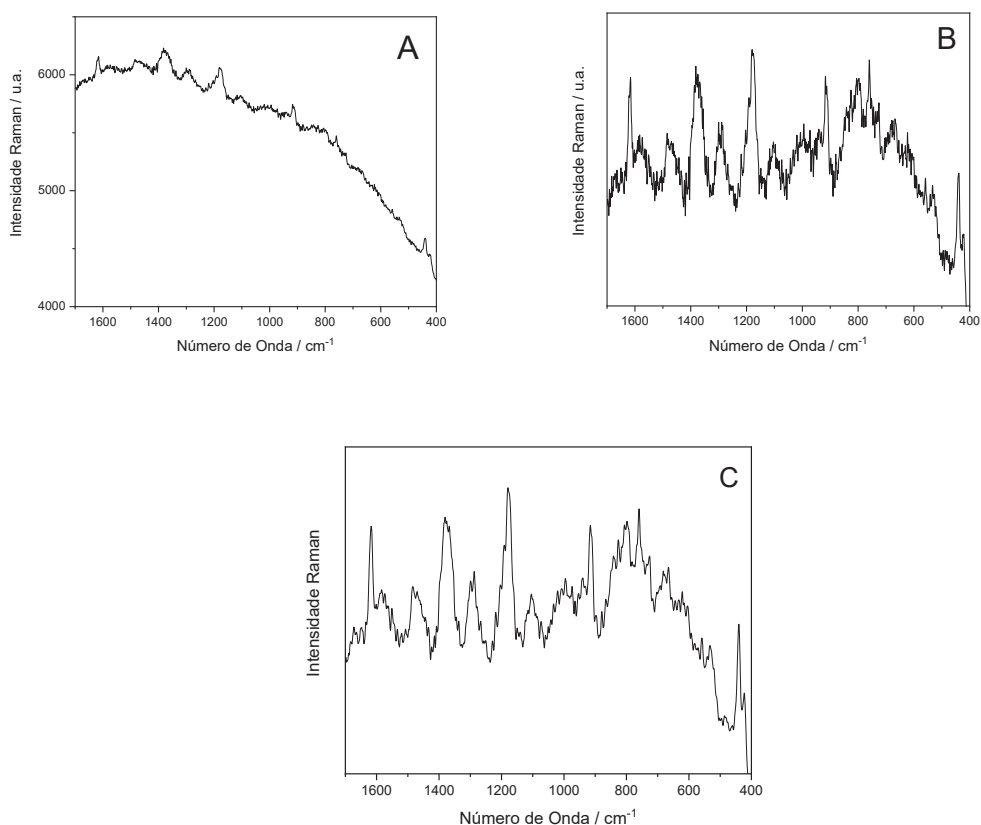
Primeiramente, foi realizado o espectro Raman do sólido do CV utilizando a radiação excitante de linha laser de comprimento 632,8 nm (Figura 15A). Ao realizar a busca à literatura, não foi encontrado o espectro Raman do CV sólido utilizando esta linha laser, por causa dessa molécula possuir transição eletrônica em ressonância com a linha laser 632,8 nm.

O espectro obtido possui uma grande banda de fluorescência, por causa da ressonância do analito com a linha laser utilizada, com isso, o efeito SERS é acrescido ao efeito RR (Raman ressonante), resultando o efeito espalhamento raman ressonante intensificado por superfície (SERRS do inglês - *Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering*).



Por causa da banda de fluorescência, foi realizado o ajuste da linha base desse espectro (Figura 15B), e em seguida por causa do espectro estar com bastante ruído foi aplicado a opção *smooth* do software utilizado para plotar os espectros com o intuito de diminuir o ruído do espectro (Figura 15C).

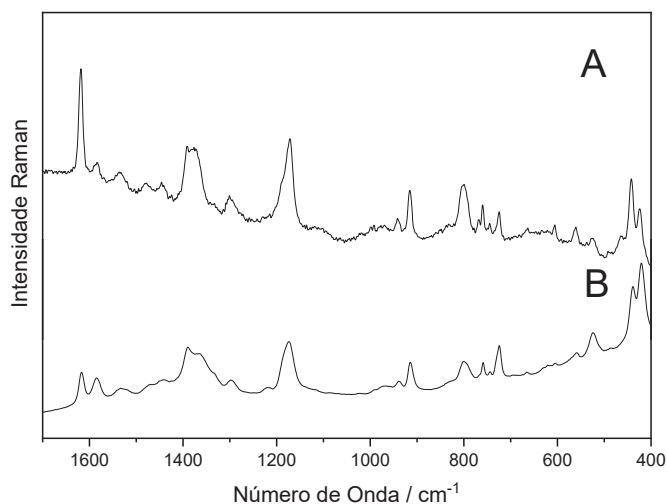
Figura 15 - Espectro Raman do CV (A), após a correção da linha base (B) e posterior ajuste *smooth* no espectro (C).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Em seguida, foi realizado o espectro SERS do CV adsorvido na AgNS, tendo como condições de medidas a radiação incidente com comprimento de onda de 632,8 nm, e radiação incidente com comprimento de onda de 785 nm, (Figura 16). A diferença espectral entre os dois espectros se dá pelo fato da ocorrência de ressonância entre a molécula e a linha laser 632,8 nm.

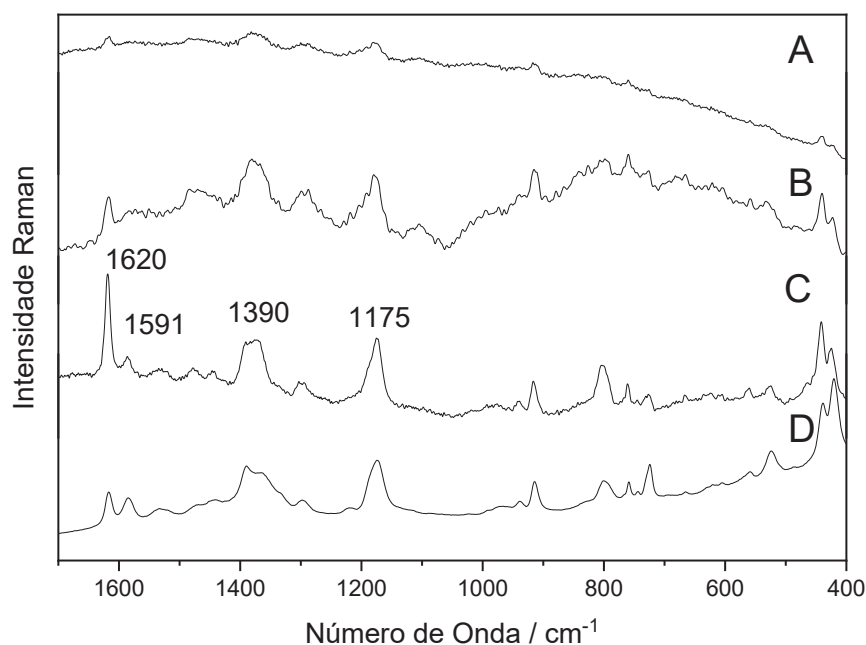
Figura 16 - Espectro SERRS e SERS do CV adsorvido na superfície do AgNS utilizando linha laser com radiação de comprimento de onda 632,8 nm (A) e com radiação de comprimento de onda 785 nm (B), respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Por fim, o espectro Raman do CV no estado sólido (Figura 17A) e após ajustes de linha base e uso da ferramenta *smooth* (Figura 17B) foi comparado com os espectros SERS do CV utilizando a linha laser de 632,8 nm (Figura 17C) e 785 nm (Figura 17D). Ao comparar os espectros foi possível observar que algumas bandas dos espectros SERS sofreram deslocamentos quando comparados com as bandas do sólido e, além do mais, notou-se a variação das intensidades relativas das bandas nos dois espectros, comprovando assim a ocorrência do efeito SERRS no caso do espectro C e o efeito SERS no espectro D.

Figura 17 - Espectro Raman do CV no estado sólido utilizando a radiação incidente de comprimento de onda de 632,8 nm (A), espectro Raman do CV após ajustes (B), espectro SERRS do CV utilizando radiação incidente do laser com comprimento de onda de 632,8 nm (C) e espectro SERS do CV utilizando radiação incidente do laser com comprimento de onda de 785 nm (D).



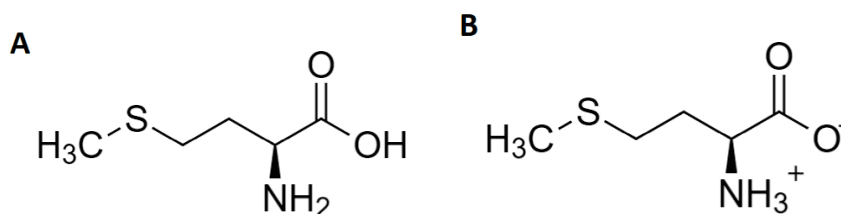
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Um exemplo interessante reportado da literatura em que é possível observar a adsorção do CV em um substrato SERS contendo nanopartículas de prata foi o realizado por MAO *et al.*, (2012). Ao comparar os espectros, estes possuem bandas iguais, mais precisamente as bandas  $1175\text{ cm}^{-1}$  referente das vibrações C-H do plano,  $1390\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento N-fenil e os modos em  $1591$  e  $1620\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento C-C do anel. Ao comparar os espectros SERS obtidos, nota-se que as bandas que sofreram as maiores intensificações relativas foram as bandas em  $1591$  e  $1620\text{ cm}^{-1}$ , indicando assim a região mais provável de adsorção do CV sobre a superfície nanoestruturada.

#### 4.2.2 Caracterização Raman e SERS da molécula MET

Após a construção das AgNS, o qual adsorveu o CV, foi decidido compreender primeiramente a interação entre estruturas mais simples que as proteínas, logo, foi construído a AgNS para adsorção do aminoácido L-Metionina. Esse aminoácido é interessante pois, além de possuir os átomos característicos em todos aminoácidos como o oxigênio e nitrogênios, possui também o átomo de enxofre (LIMA JR *et al.*, 2013). O valor do pKa desse aminoácido é 2,28 (DRUG BANK, 2021), e como o pH do coloide é por volta de 6, pode-se afirmar que a estrutura da MET (Figura 18A) no meio coloidal será sua estrutura zwitteriônica (Figura 18B).

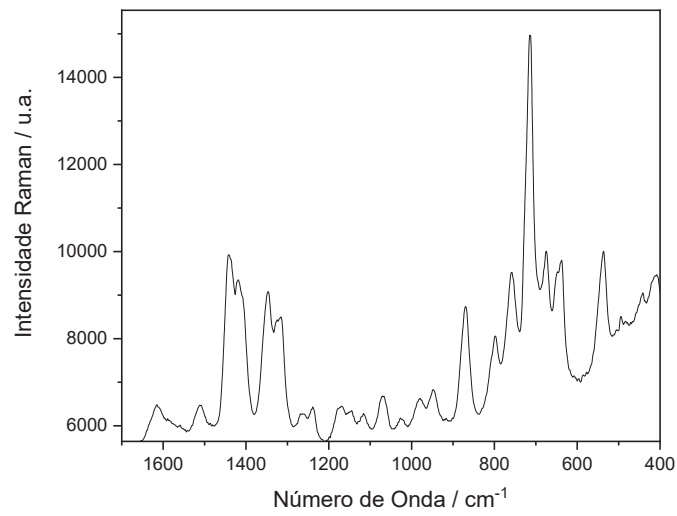
Figura 18 - Estrutura neutra da MET (A) e sua estrutura zwitteriônica (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

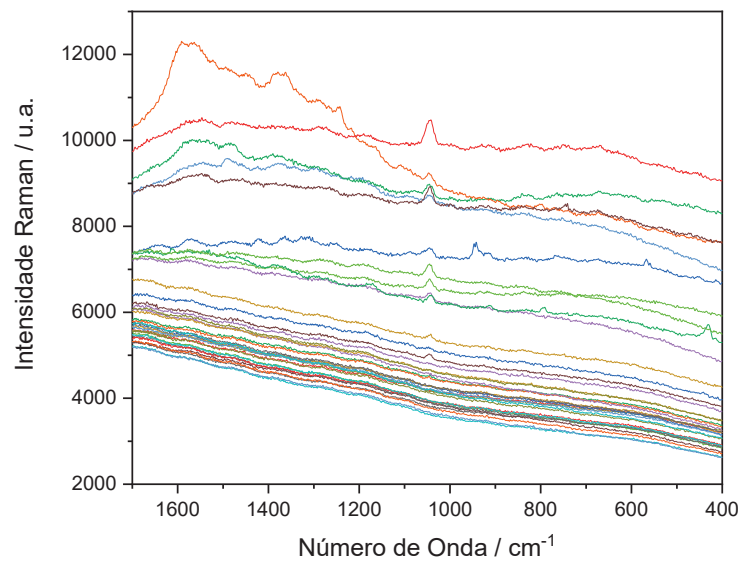
O espectro Raman do sólido MET (Figura 19) foi obtido. Como forma de estudar, a maneira da adsorção da metionina na superfície de prata foi realizada para a medida nesse filme um mapeamento de 36 pontos (Figura 20). Desses 36 espectros, foram selecionados 8 espectros os quais apresentaram um padrão espectral considerado referente a metionina (Figura 21).

Figura 19 - Espectro Raman da MET em estado sólido.



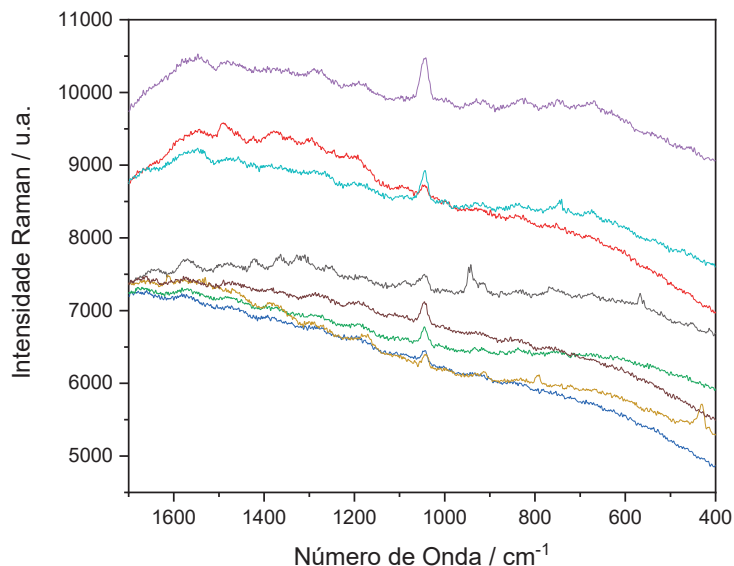
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 20 - Mapeamento SERS de 36 pontos da MET adsorvida na AgNS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

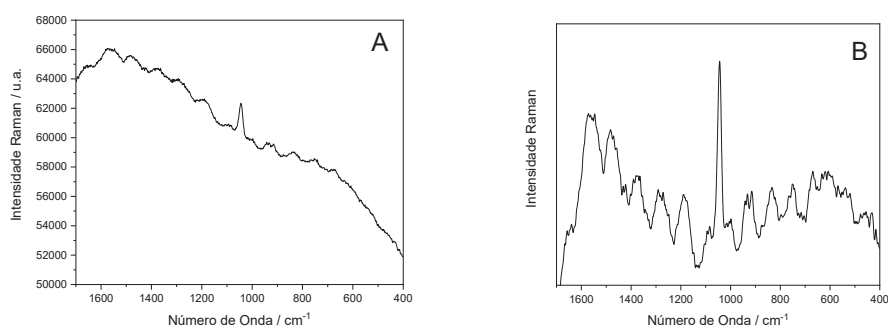
Figura 21 - Seleção de 8 espectros do mapeamento SERS de 36 pontos da MET adsorvida na AgNS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

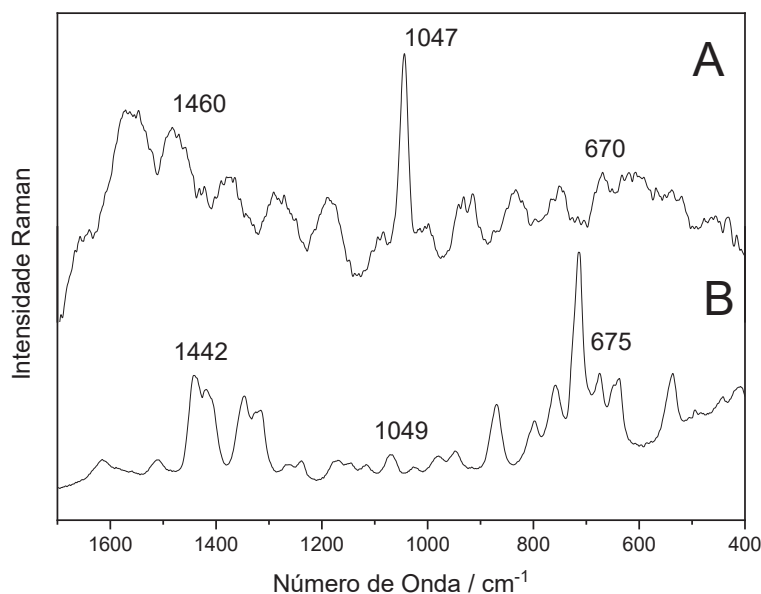
Antes de executar-se a soma dos espectros eles foram normalizados para que as intensidades do fundo não interferissem no espectro médio. Após realizar a soma dos espectros (Figura 22A), em seguida, foi realizado a correção da linha base desse espectro e uso da ferramenta *smooth* para diminuição do ruído (Figura 22B) para depois compará-lo com o espectro Raman (Figura 23) para que se possa realizar a tentativa de atribuição de banda.

Figura 22 - Espectro SERS média da MET (A) e o espectro SERS média da MET após os ajustes (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 23 - Espectro SERS da MET adsorvida na AgNS (A) e espectro Raman da MET (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

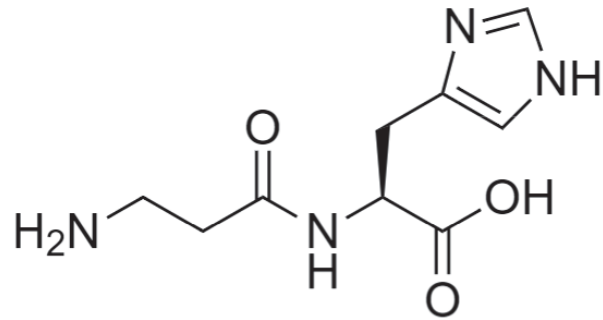
Segundo o trabalho de GRAFF & BUKOWSKA (2011) foi possível atribuir as bandas do espectro Raman em 675, 1049 e 1442  $\text{cm}^{-1}$  sendo referentes aos modos vibracionais do estiramento carbono – enxofre, estiramento carbono – nitrogênio e ao estiramento  $\text{COO}^-$ , respectivamente, tiveram aumento na intensidade relativa como observado no espectro SERS em 670, 1047 e 1460  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

Com isso, conclui-se que a metionina foi adsorvida na superfície da superfície nanoestruturada de prata, tanto pelo nitrogênio quanto pelo grupo carboxilato presente em sua estrutura.

#### 4.2.3 Caracterização Raman e SERS da molécula CAR

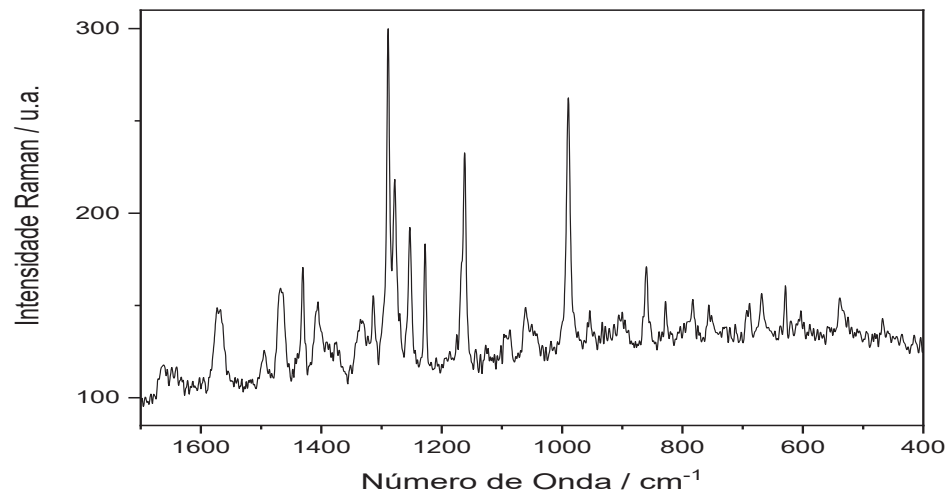
Depois de construir o filme nanoestruturado de prata, e adsorver um aminoácido, foi construído uma outra superfície nanoestruturada nas mesmas condições para adsorção de um outro analito composto por dois aminoácidos, ou seja, um dipeptídeo, que no caso foi a L-Carnosina (Figura 24). Foi obtido o espectro Raman do sólido da L-Carnosina (Figura 25), e em seguida foi realizado um mapeamento SERS de 36 pontos (Figura 26), onde foi selecionado um espectro (Figura 27) para que fosse comparado com o espectro Raman, para assim, pudesse ser realizada a tentativa de atribuição de bandas (Figura 28).

Figura 24 - Estrutura da L-Carnosina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

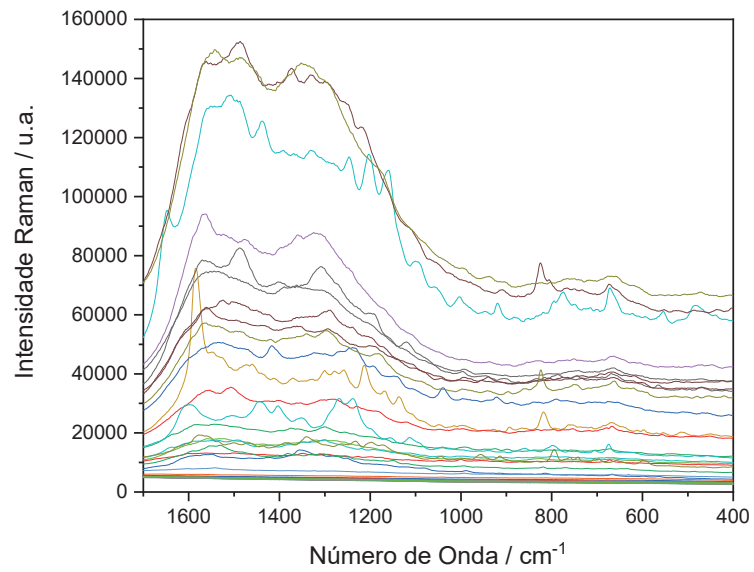
Figura 25 - Espectro Raman da L-Carnosina em estado sólido.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

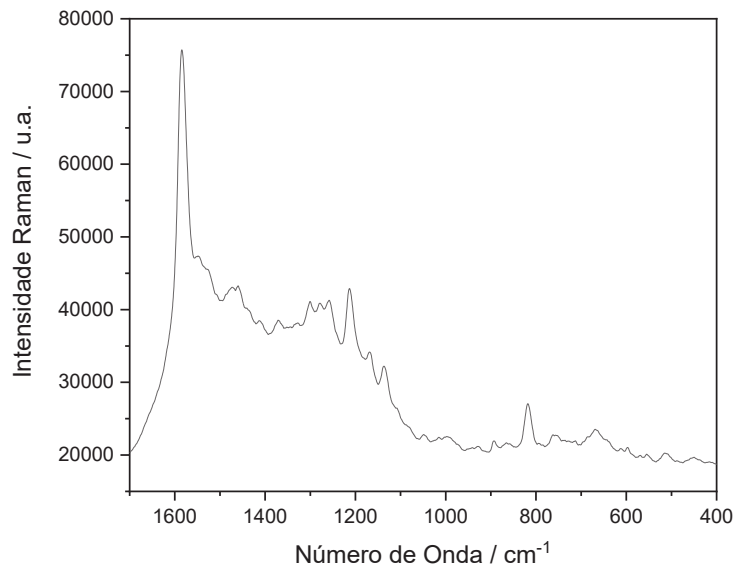


Figura 26 - Mapeamento SERS de 36 pontos da CAR adsorvida na AgNS.



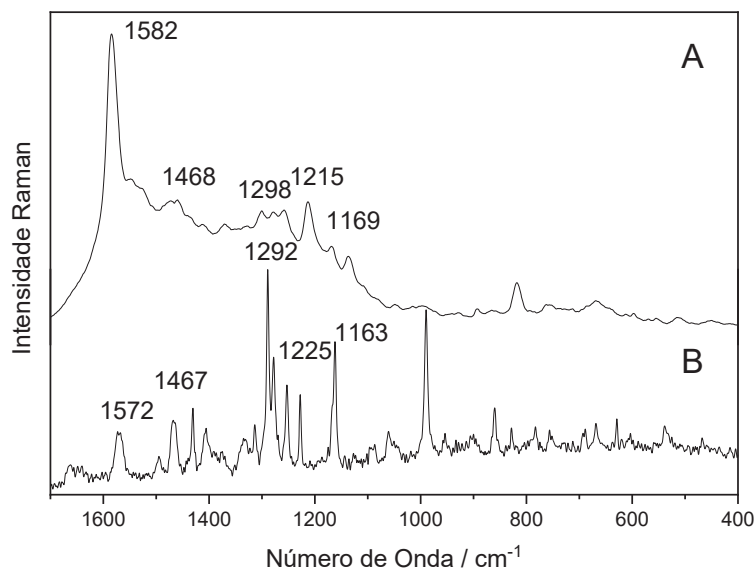
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 27 - Seleção de um espectro do mapeamento SERS de 36 pontos da CAR adsorvida na AgNS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 28 - Espectro SERS da CAR adsorvida na AgNS (A) e espectro Raman da CAR (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Apesar da tentativa de atribuição das bandas ter sido realizada a partir da escolha de um único espectro dentre os 36 presentes no mapeamento, as bandas SERS obtidas foram semelhantes às registradas por THOMAS *et al.* (2010), em superfície de prata, e CARVALHO (2012), sobre superfície de ouro e usando a radiação excitante de comprimento de onda 1064 nm. De acordo com o trabalho de THOMAS *et al.*, (2010) as bandas no espectro Raman 1163, 1225, 1292, 1467 e 1572  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos modos vibracionais N-H do anel imidazólico e o estiramento do C-N do anel, C-H do anel imidazólico e deformação N-H, estiramento C-N respiração do anel, estiramento C-N anel imidazólico e estiramento C-C do anel imidazólico, respectivamente, tiveram aumento na intensidade relativa como observado no espectro SERS em 1169, 1215, 1298, 1468 e 1582  $\text{cm}^{-1}$ .

Ao observar o mapeamento realizado, os espectros obtidos foram muito diferentes entre si o que implica em uma baixa reprodutibilidade espectral., conclui-se que a L-Carnosina tem baixa afinidade com a superfície de prata, mas no ponto em que ocorreu a adsorção preferencialmente, essa se deu pelo anel histidínico.

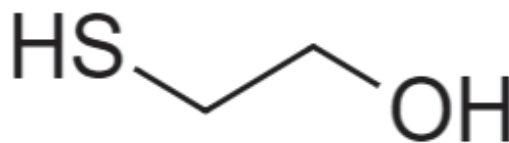
#### 4.2.4 Mapeamentos SERS das proteínas

A partir dessa seção, foram realizados mapeamentos na ausência e presença do ME para entender sua influência no mecanismo de adsorção das proteínas.

##### 4.2.4.1 Espectro SERS obtido do ME

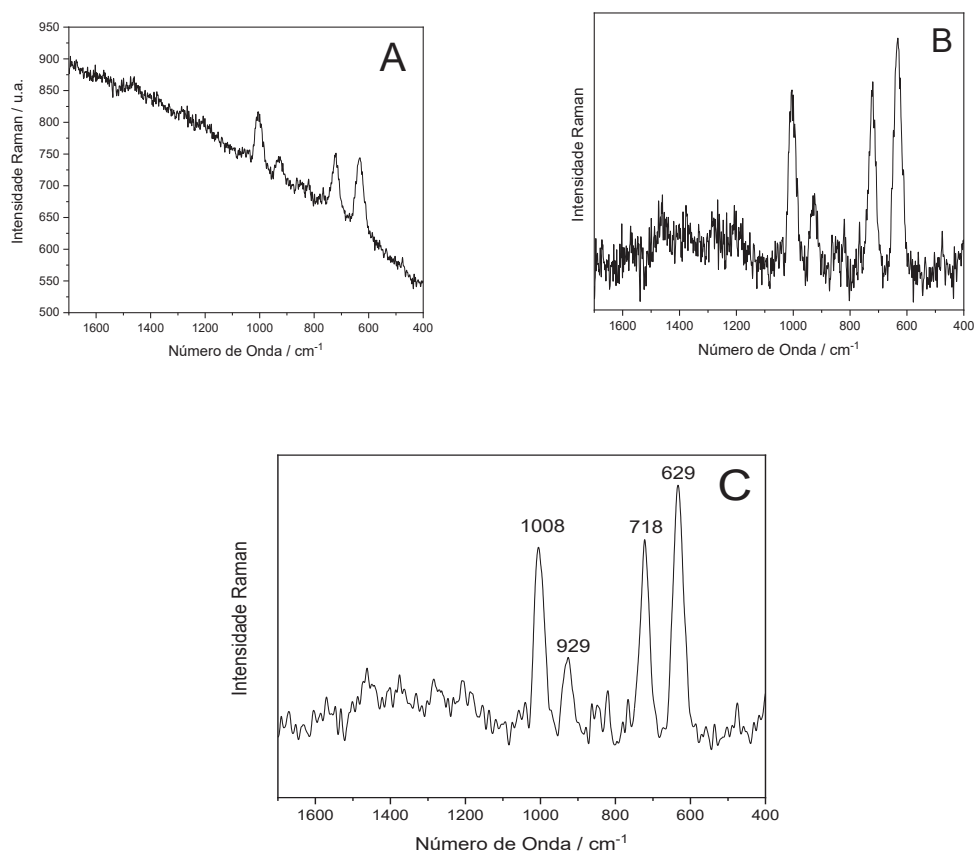
A estrutura do ME segue abaixo (Figura 29). Foi construída uma superfície nanoestruturada de prata somente para adsorção do ME (Figura 30), onde o espectro obtido antes (A) e após a correção da linha base (B) e em seguida do uso da ferramenta *smooth* (C), pode ser observado abaixo.

Figura 29 - Estrutura do ME.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 30 - Espectro SERS do ME adsorvido na AgNS (A), espectro SERS do ME com linha base corrigida (B) e após o uso da ferramenta *smooth* (C).



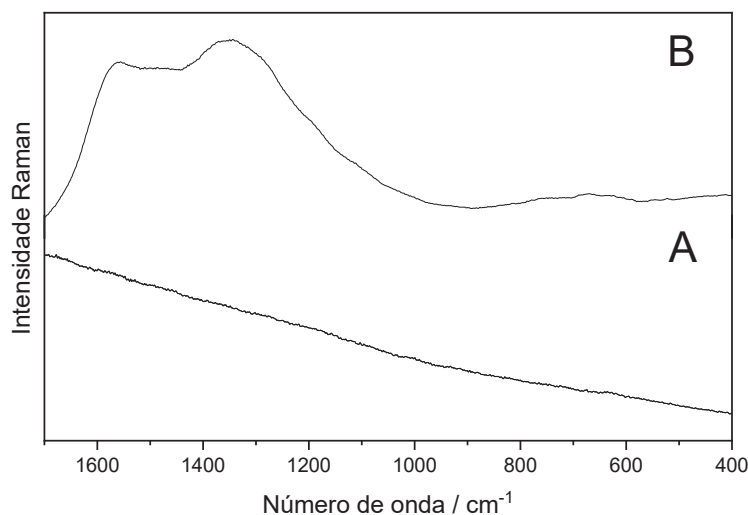
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

De acordo com Kudelski (2003), foi possível observar o aparecimento das mesmas bandas no espectro SERS obtido, constatando assim a ocorrência do efeito SERS, mais precisamente as bandas indicadas no espectro são todas referentes ao estiramento carbono – enxofre.

#### 4.2.4.2 Padrões espectrais presentes em todos os mapeamentos realizados

É importante ressaltar que, ao começar a realizar as medidas das amostras de BSA, Anti-BSA e Anti-FOL alguns padrões espectrais se repetiram em todas as medidas de mapeamento SERS. Os padrões espectrais que se fizeram presentes em todos os mapeamentos foram nomeados como padrão espectral (A) e padrão espectral (B) (Figura 31).

Figura 31 - Espectros SERS com grande reprodutibilidade (A) e (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

No caso do padrão espectral da Figura 31A, é possível dizer que as nanopartículas de prata não entraram em ressonância com a linha laser utilizada (632,8 nm), com isso não houve a formação de espectro algum, além do mais, todos os filmes construídos possuem uma natureza heterogênea, ou seja, eles não são distribuídos igualmente sobre a lâmina de vidro. Já o padrão espectral da Figura 31B indica a presença de duas bandas largas na região de 1200 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  que indicam a ação conjunta das nanoestruturas de prata que possuem uma propriedade catalítica, aliada com a ação do laser, mesmo quando aplicada baixa potência, e a natureza orgânica da amostra, que levam à decomposição da mesma, uma vez que essas bandas são atribuídas ao carbono amorfo e a hidrocarbonetos (SANT'ANA *et al.*, 2004). Esse perfil espectral foi observado em maioria, nos mapeamentos os quais foram aplicadas as potências do laser maiores que 2 mW.

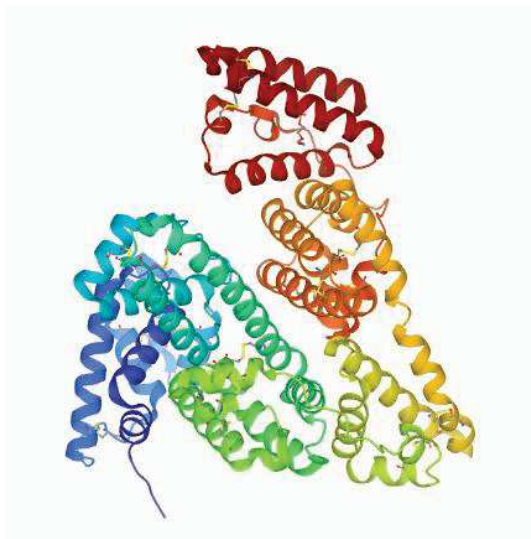
#### 4.2.5 Caracterização Raman e SERS da proteína BSA

Nessa seção serão apresentados e discutidos os resultados referentes aos espectros Raman e SERS da proteína BSA.

#### 4.2.5.1 Espectro Raman da molécula BSA

A Figura 32 representa a estrutura da molécula BSA.

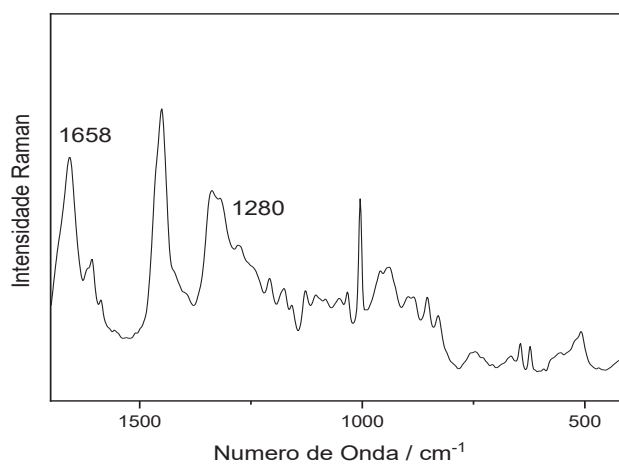
Figura 32 - Estrutura da proteína BSA (4F5S) em 3D.



Fonte: Protein Data Bank (2013).

O espectro Raman da molécula de BSA no estado sólido foi obtido a partir do uso da radiação incidente com comprimento de onda de 1064 nm (Figura 33).

Figura 33 - Espectro Raman do sólido da BSA.



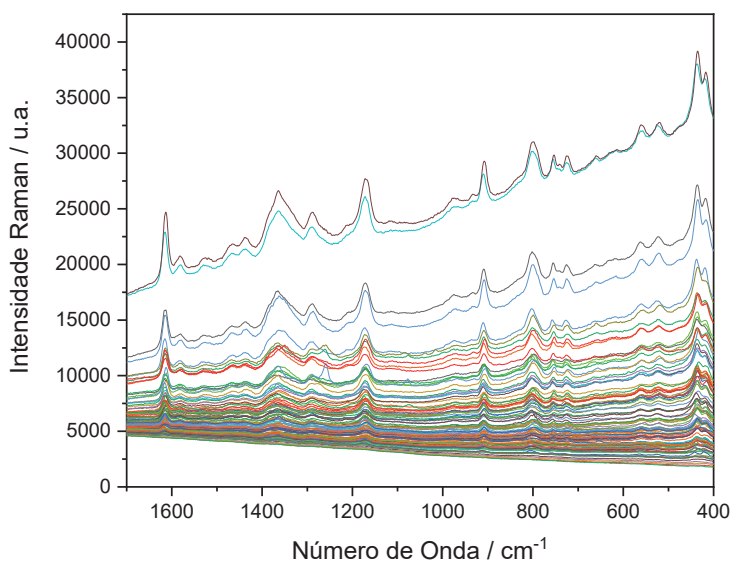
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

É importante destacar no espectro as bandas em  $1280\text{ cm}^{-1}$  e  $1658\text{ cm}^{-1}$ , que são referentes aos modos vibracionais relacionados a amida III e amida I respectivamente, segundo Lin *et al.*, (1976) e Han *et al.*, (2008).

#### 4.2.5.2 Espectros SERS da molécula BSA adsorvida na AgNS na ausência do ME

Nos resultados abaixo, temos as figuras referentes ao mapeamento SERS AgNS obtidos pelo método 1 (Figura 34).

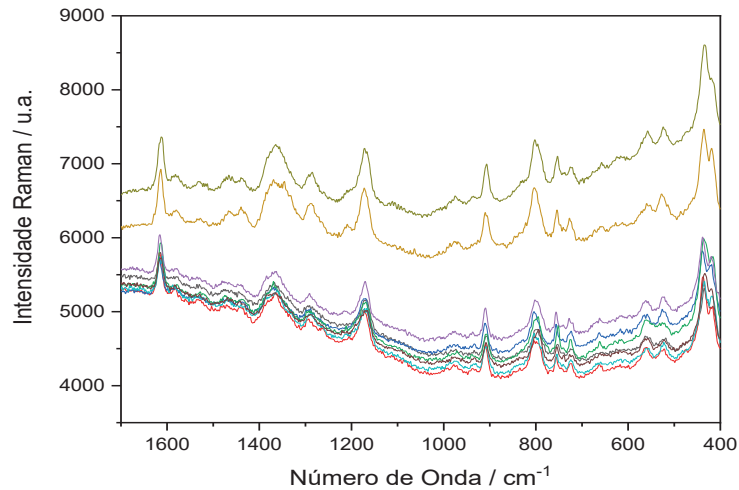
Figura 34 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da BSA adsorvida na AgNS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A partir do mapeamento, notou-se a presença dos padrões citados no item 4.2.4.2., e além disso, foi possível observar conjuntos de espectros diferentes entre si, sendo um conjunto possível de ser agrupado (Figura 35). Essa diferença dos padrões espectrais presentes no mapeamento indica diferentes condições de ressonância das nanoestruturas locais, que geraram diferentes padrões de emissão.

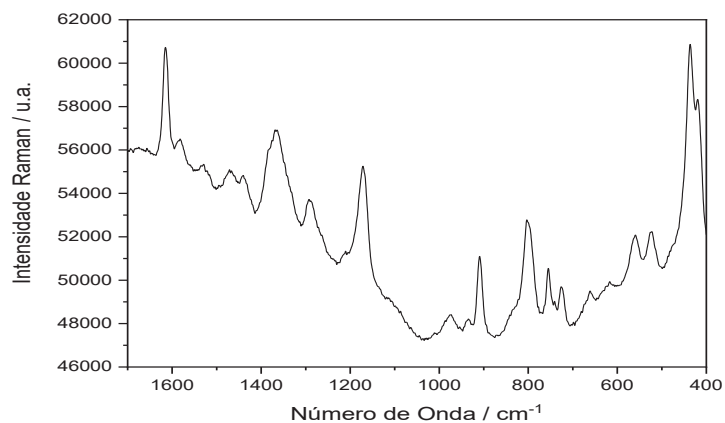
Figura 35 - Seleção de 9 espectros que representam o padrão espectral em maioria presente no mapeamento SERS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Em seguida, foi realizada a soma dos espectros (Figura 36), sendo o espectro resultante a média das geometrias de adsorções da BSA adsorvida na AgNS.

Figura 36 - Espectro SERS médio da BSA, obtido dos espectros selecionados do mapeamento SERS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

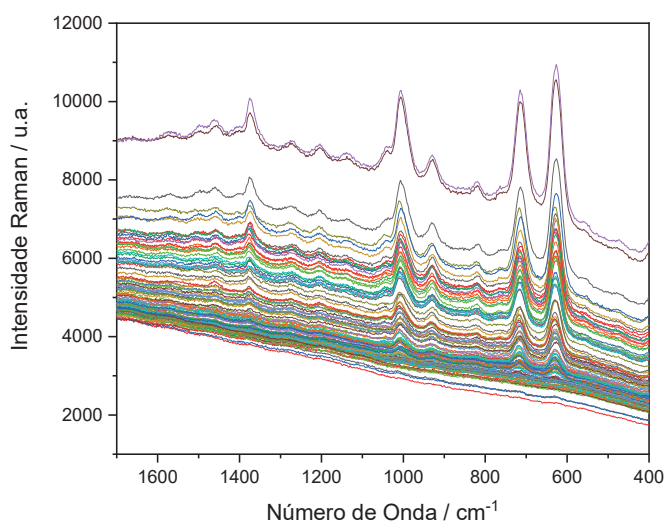
Posteriormente, o espectro médio foi comparado com o espectro do sólido da BSA para que assim fosse realizado a tentativa de atribuição de banda.



#### 4.2.5.3 Espectros SERS da molécula BSA adsorvida na AgNS na presença do ME

Nos resultados apresentados abaixo, tem-se o espectro SERS da BSA adsorvida sobre a superfície nanoestruturada obtida pelo método 2 (presença do ME). Neste tópico foi investigado o tipo de geometria de adsorção que a mercaptana conferiu para a BSA ao interagir com superfície de prata. Foi obtido o mapeamento SERS de 100 espectros da BSA adsorvida na superfície nanoestruturada de prata na presença de ME (Figura 37).

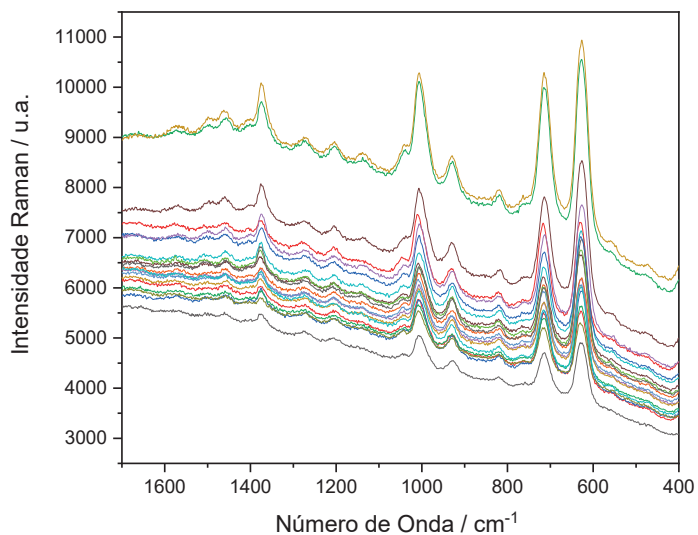
Figura 37 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da BSA na presença de ME adsorvidas na AgNS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A partir do mapeamento, notou-se a presença dos padrões citados no item 4.2.4.2., e além disso, foi possível observar padrões espectrais parecidos entre si, assim, foram selecionados 20 espectros que representam o todo presente no mapeamento (Figura 38).

Figura 38 - Seleção dos 20 espectros com padrão espectral semelhante presente no mapeamento SERS.

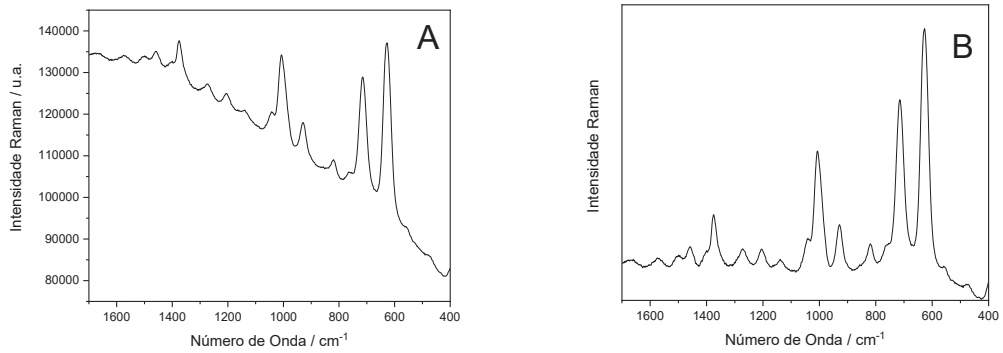


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Observando os 20 espectros selecionados e, levando em consideração que, estes representam os espectros presentes no mapeamento, constatou-se que os espectros são reprodutíveis entre si, concluindo que o ME ancora a BSA da mesma forma em todos os espectros obtidos.

Os espectros selecionados por serem bastante representativos do todo, foram somados, (Figura 39A) e, após a correção da linha base (Figura 39B), esse espectro foi comparado com o espectro do sólido da BSA para que assim fosse feita uma tentativa de atribuição de banda (Figura 40).

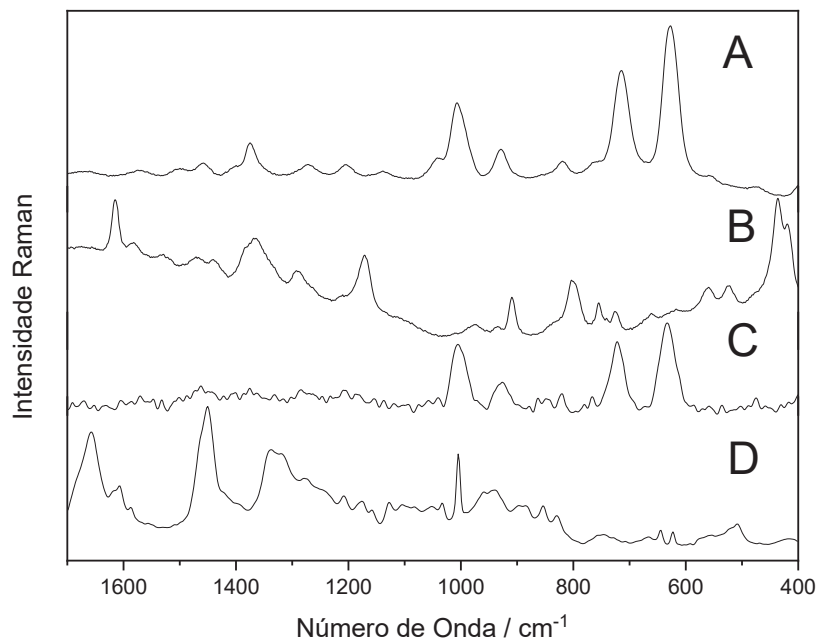
Figura 39 - Espectro soma daqueles selecionados no mapeamento SERS antes (A) e após a correção da linha base (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Por fim, foi possível comparar os espectros com a presença e ausência do ME, com o espectro SERS do ME e o espectro Raman do sólido da BSA.

Figura 40 - Espectros SERS da BSA adsorvida na AgNS na presença (A), e na ausência do ME (B), espectro SERS do ME adsorvido na AgNS (C) e espectro Raman do sólido de BSA (D).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Baseado nos trabalhos de Lin *et al.*, (1976) e Han *et al.*, (2008), foi possível atribuir as bandas presentes nos espectros obtidos. Nota-se que entre os espectros (A) e (B), algumas bandas são as mesmas, sendo todas intensificadas nos espectros SERS quando comparadas com o espectro Raman do sólido (D). As bandas no espectro Raman em 824, 1272, 1393 e 1451  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos modos vibracionais do aminoácido tirosina, da amida III, do aminoácido tirosina e da deformação  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente, tiveram aumento na intensidade relativa como observado no espectro SERS da Figura 40A em 820, 1270, 1374 e 1458  $\text{cm}^{-1}$  e da Figura 40B em 801, 1288, 1368 e 1458  $\text{cm}^{-1}$ .

As bandas presentes nos espectros SERS da Figura 40A e 40C em 629, 715, 929 e 1004 são, segundo o trabalho de Kudelski (2003) devido ao estiramento carbono – enxofre devido a presença do ME.

A bandas no espectro Raman (Figura 40D) em 1123, 1207 e 1340  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos modos vibracionais ao estiramento carbono – nitrogênio, presença dos aminoácidos tirosina ou fenilalanina e a presença do aminoácido triptofano, respectivamente, tiveram aumento na intensidade relativa como observado no espectro SERS (A) em 1136, 1203 e 1343  $\text{cm}^{-1}$ .

A bandas no espectro Raman (D) 507, 642, 1163, 1585 e 1608  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos modos vibracionais do estiramento enxofre – enxofre, estiramento carbono – enxofre indicando a presença dos aminoácidos cisteína ou metionina, presença do aminoácido tirosina, presença do aminoácido fenilalanina e a presença do aminoácido tirosina e triptofano, respectivamente, tiveram aumento na intensidade relativa como observado no espectro SERS (B) em 521, 657, 1171, 1585 e 1607  $\text{cm}^{-1}$ .

Segundo os trabalhos de DHAMELIN COURT & RAMÍREZ (1991), TORTONDA *et al.*, (1998) e MARCHEWKA *et al.*, (2011), a banda no espectro Raman (Fig. 40D) em 440  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao modo vibracional da deformação angular do estiramento carbono – nitrogênio, provavelmente indicando a presença dos aminoácidos alanina ou ácido glutâmico, teve aumento na intensidade relativa como observado no espectro SERS (Fig. 40B) em 440  $\text{cm}^{-1}$ .

Abaixo, segue a tabela 7 contendo as atribuições dos outros modos presentes nos espectros da Figura 40.

Tabela 7 - Número de onda em  $\text{cm}^{-1}$  dos espectros da figura 40 e atribuições baseadas na literatura.

BSA (sólido)	SERS ME	SERS BSA-ME	SERS BSA	Atrib. Kudelski, 2003	Atrib. Han, 2008	Atrib. Lin, 1976
1608	-	-	1607	-	Tyr e Trp	-
1585	-	-	1585	-	Phe	-
1451	-	1458	1458	-	$\delta$ CH <sub>2</sub>	$\delta$ CH <sub>2</sub>
1393	-	1374	1368	-	Tyr	-
1340	-	1343	-	-	Trp	-
1272	-	1270	1288	-	Amida III	Amida III
1207	-	1203	-	-	Tyr ou Phe	Tyr + Phe
1163	-	-	1171	-	Tyr	$\nu$ (C – N)
1123	-	1136	-	-	-	$\nu$ (C – N)
-	1008	1004	-	$\nu$ (C-S)	-	-
891	-	-	908	-	-	Tyr
-	929	929	-	$\nu$ (C-S)	-	-
824	-	820	801	-	Tyr	Tyr
-	718	715	-	$\nu$ (C-S)	-	-
642	-	-	657	-	-	$\nu$ (C- S)
-	629	629	-	$\nu$ (C-S)	-	-
507	-	-	521	-	-	$\nu$ (S – S)
440	-	-	440	-	-	$\nu$ (C- N)

Legenda: Fenilalanina (Phe), Tyr (Tirosina), Trp (Triptofano), Cys (Cisteína), Met (Metionina), Cys (Cisteína),  $\nu$  (Estiramento),  $\delta$  (Deformação).

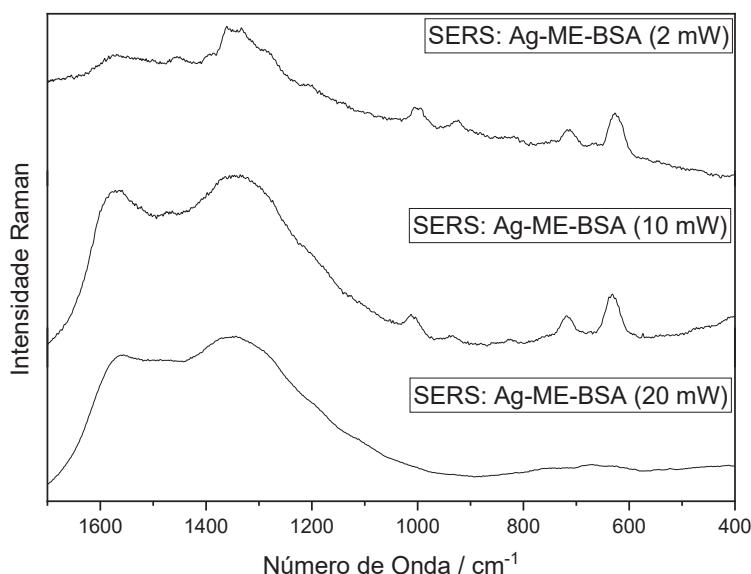
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2022).

#### 4.2.5.4 Efeito da potência nas amostras

A influência da potência no momento da realização das medidas foi investigada. Foi comparado os espectros SERS do tipo “Ag-ME-BSA” obtidos a partir do uso da potência

nominais de 20 mW, 10 mW e 2 mW e, respectivamente, potência real de 10 mW, 5 mW e 1 mW (Figura 41).

Figura 41 - Espectros SERS da BSA adsorvida na AgNS na presença do ME com diferentes valores de potências aplicadas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

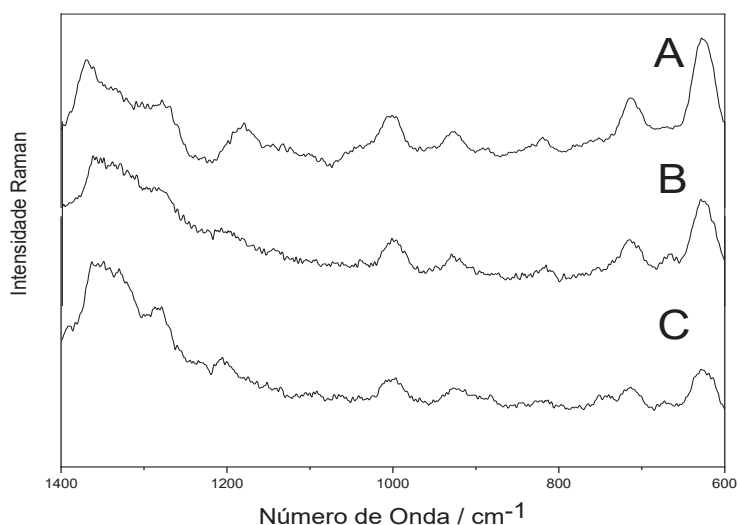
Foi observado que, ao aplicar a potência de 1 mW, tanto as bandas referentes a BSA quanto as bandas do ME foram observadas. Ao aplicar uma potência de 5 mW, as bandas da BSA foram suprimidas por uma grande banda entre 1250 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ , sendo possível observar somente as bandas referentes ao ME. Ao aplicar uma potência de 10 mW, as bandas da BSA e do ME são suprimidas pela banda larga de 1250 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ . Essa banda larga pode ser associada a banda do SERS do carbono amorfo (SANT'ANA *et al.*, 2004), que é formado com o contato do  $\text{CO}_2$  da atmosfera com as nanopartículas, como também pode ser formada a partir do uso de uma potência “alta” que resulta na carbonização das amostras. Essa análise foi importante pois influenciou todos os resultados deste trabalho.

#### 4.2.5.5 Reprodutibilidade de sinal

Outro fator investigado foi acerca da reprodutibilidade de sinal quanto a diferença dos tamanhos das AgNPs. Isso é evidenciado a partir dos espectros UV-VIS-NIR e da diferença das colorações das soluções coloidais (Figura 9). Isso pode ser observado nos espectros SERS

da BSA, a partir do uso de diferentes sínteses, e em consequência, com diferentes tamanhos de nanopartículas para a construção das superfícies nanoestruturadas com a presença de ME (Figura 42).

Figura 42 - Espectro SERS da BSA adsorvida na AgNS na presença do ME a partir do uso da síntese avermelhada (A), a partir da síntese alaranjada (B) e a partir da síntese arroxeada (C).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Com os resultados apresentados e, ao comparar as três soluções de AgNPs, pode-se inferir que houve a reprodutibilidade em relação às bandas observadas e suas intensidades relativas, ou seja, a partir de sínteses com tamanhos de nanopartículas diferentes, obteve-se espectros similares entre si ao adsorver o ME e a BSA sobre as superfícies nanoestruturadas. Conclui-se então que, qualquer uma das sínteses exibiria o mesmo resultado para realização deste trabalho, pois as propriedades químicas da superfície são as mesmas, independente das distribuições de tamanho das nanopartículas.

#### 4.2.6 Caracterização SERS do anticorpo Anti-BSA

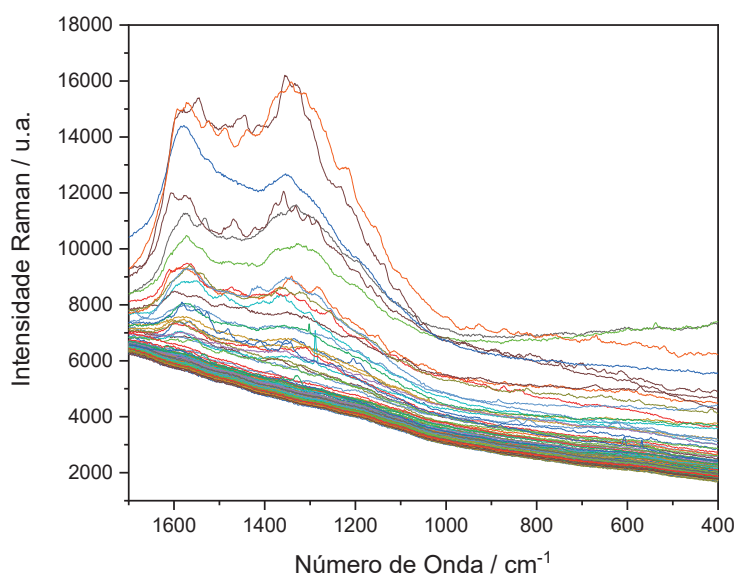
Os anticorpos são um tipo de proteína que desempenham funções importantes nos organismos humanos. Para a realização deste trabalho não foi possível obter o espectro Raman da solução de Anti-BSA pelo fato da quantidade do analito não ter sido suficiente. No

entanto, foram obtidos os espectros SERS da Anti-BSA, tanto na ausência, quanto na presença do ME.

#### 4.2.6.1 Espectros SERS da molécula Anti-BSA adsorvida na AgNS na ausência do ME

Nos resultados abaixo, temos as figuras referentes ao mapeamento SERS da AgNS obtidos pelo método 1, sendo a fonte de excitação do laser com comprimento de onda em 632,8 nm (Figura 43).

Figura 43 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-BSA adsorvida na AgNS.

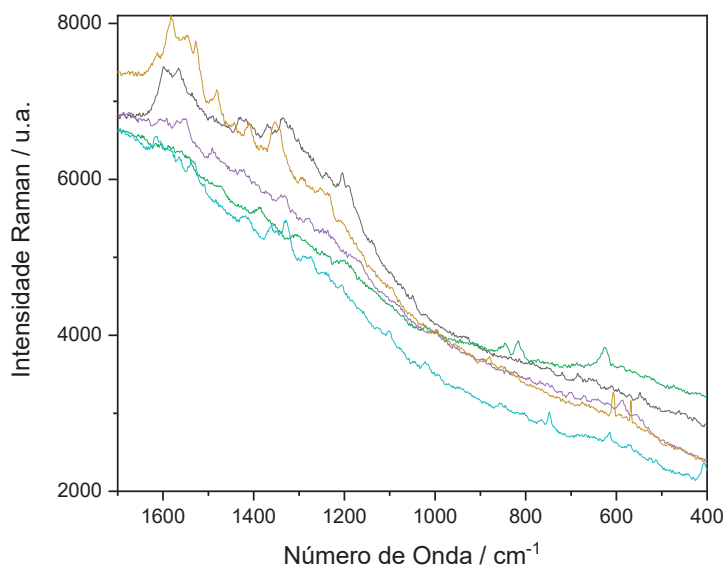


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A partir do mapeamento, notou-se a presença dos padrões citados no item 4.2.4.2., e além disso, observou-se nos espectros presente no mapeamento uma baixa reprodutibilidade, ou seja, os espectros foram muito diferentes entre si. Dessa forma, foram selecionados 5 espectros os quais foi possível observar o padrão espectral com as bandas que possivelmente pertencem ao anticorpo (Figura 44).



Figura 44 - Seleção de 5 espectros presentes no mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-BSA adsorvida na AgNS.



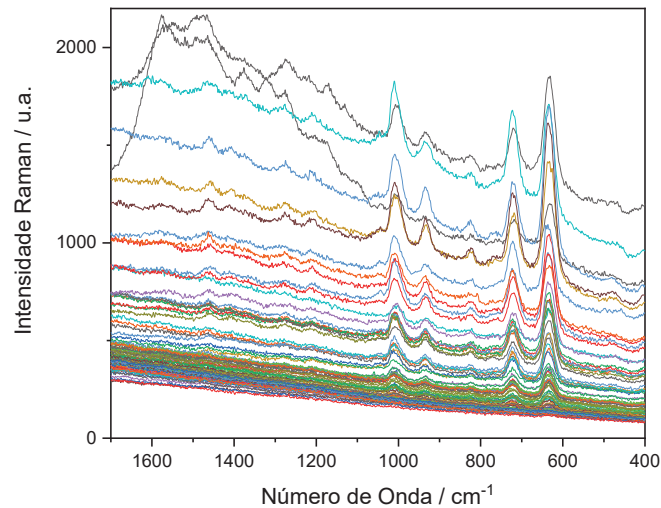
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Como os espectros selecionados estão diferentes entre si, pode-se inferir que a interação desse anticorpo com a AgNS não ocorre através de sítios preferenciais.

#### 4.2.6.2 Espectros SERS da molécula Anti-BSA adsorvida na AgNS na presença do ME

Nos resultados abaixo, tem-se as figuras referentes ao mapeamento SERS na AgNS obtidos pelo método 2 (Figura 45).

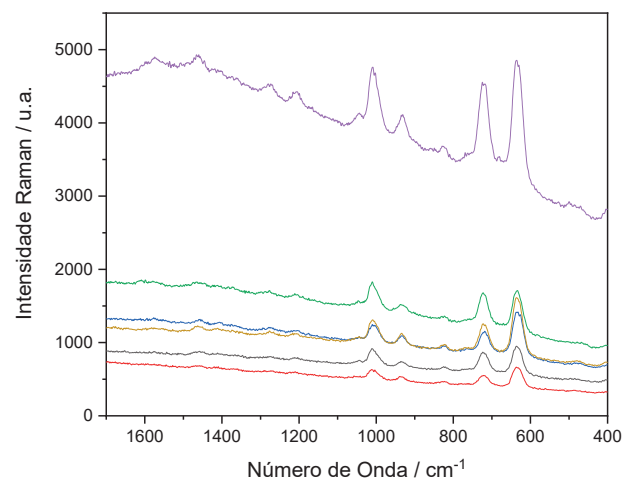
Figura 45 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-BSA adsorvida na AgNS na presença do ME.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A partir do mapeamento, notou-se a presença dos padrões citados no item 4.2.4.2., e além disso, observou-se nos espectros presente no mapeamento uma boa reprodutibilidade, ou seja, os espectros são muito parecidos entre si. Dessa forma, foram selecionados 5 espectros (Figura 46).

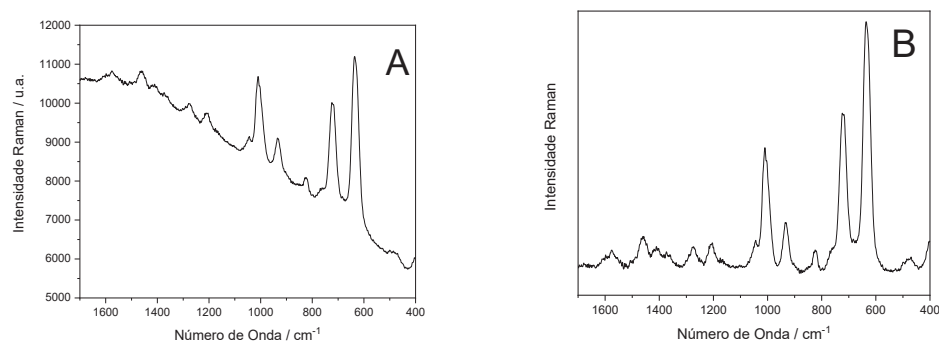
Figura 46 - Seleção de 5 espectros presentes no mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-BSA adsorvida na AgNS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Como os espectros estão parecidos entre si, optou-se de realizar um somatório dos mesmos, com o intuito de se obter um espectro soma e assim diminuir os ruídos espectrais, para que no final fosse obtido um espectro capaz de ser comparado com o espectro SERS do ME. Após somar esses 5 espectros (Figura 47A), se fez necessário corrigir a linha base para que fosse possível visualizar melhor as bandas características da Anti-BSA (Figura 47B).

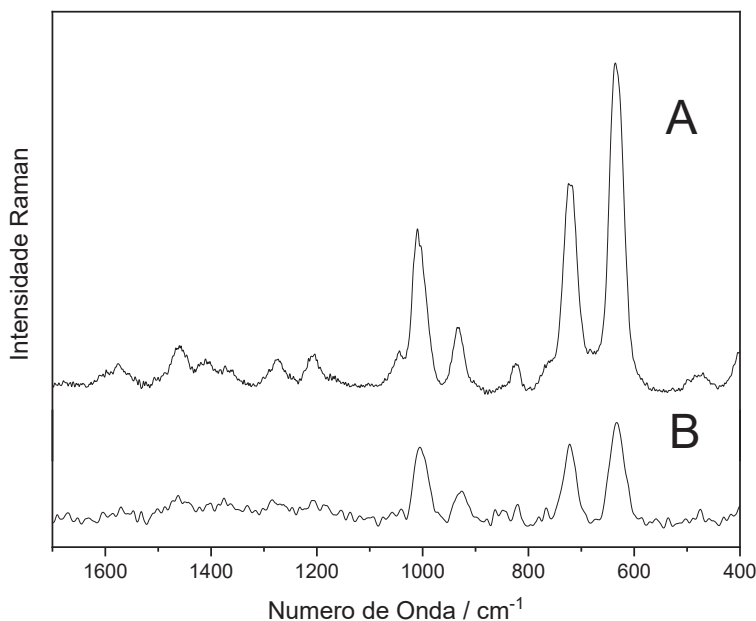
Figura 47 - Espectro soma dos 5 espectros (A) e espectro soma dos 5 espectros após correção da linha base (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Com isso, pode-se comparar os dois espectros obtidos (Figura 48): espectro soma com linha base corrigida (A) e o espectro SERS do ME (B), para assim, realizar a tentativa de atribuição de bandas.

Figura 48 - Espectro SERS da Anti-BSA adsorvida na AgNS na presença do ME (A) e espectro SERS do ME adsorvido na AgNS (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

De acordo com os trabalhos de ARÊAS & KAWANO (1991), GNIADÉCKA *et al.*, (1998) e ZHANG *et al.*, (2008) foi realizada a tentativa de atribuição de bandas.

A banda no espectro SERS em  $1272\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao modo de amida III. A banda no espectro SERS em  $1458\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento  $\text{CH}_2$ , referente a presença do aminoácido triptofano. A banda no espectro SERS em  $1572\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$  indicando a presença dos aminoácidos ácido aspártico e ácido glutâmico.

As bandas presentes nos dois espectros em 629, 715, 929 e  $1004\text{ cm}^{-1}$  são, segundo o trabalho de Kudelski (2003) devido ao estiramento carbono – enxofre devido a presença do ME.

Segundo os trabalhos de DHAMELIN COURT & RAMÍREZ (1991), TORTONDA *et al.*, (1998) e MARCHEWKA *et al.*, (2011), a banda no espectro SERS (A) em  $478\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao modo vibracional da deformação angular do estiramento carbono – nitrogênio, provavelmente indicando a presença dos aminoácidos alanina ou ácido glutâmico.

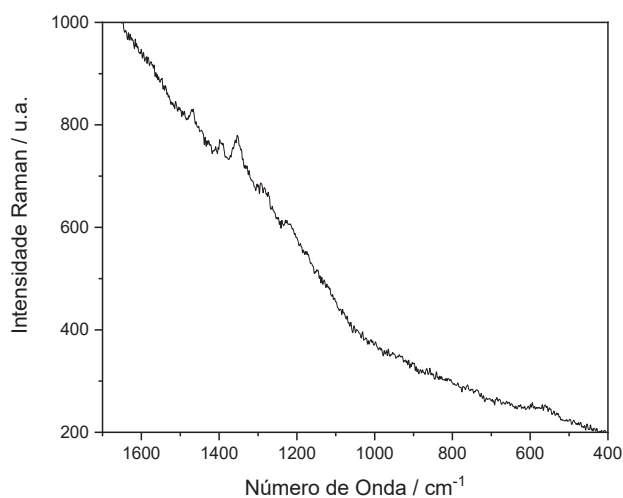
#### 4.2.7 Caracterização Raman e SERS do anticorpo Anti-FOL

Neste trabalho, também foi utilizado o anticorpo Anti-FOL. Foram obtidos os espectros Raman da solução de Anti-FOL além dos espectros SERS da Anti-FOL, tanto na ausência, quanto na presença do ME.

##### 4.2.7.1 Espectro Raman da molécula Anti-FOL

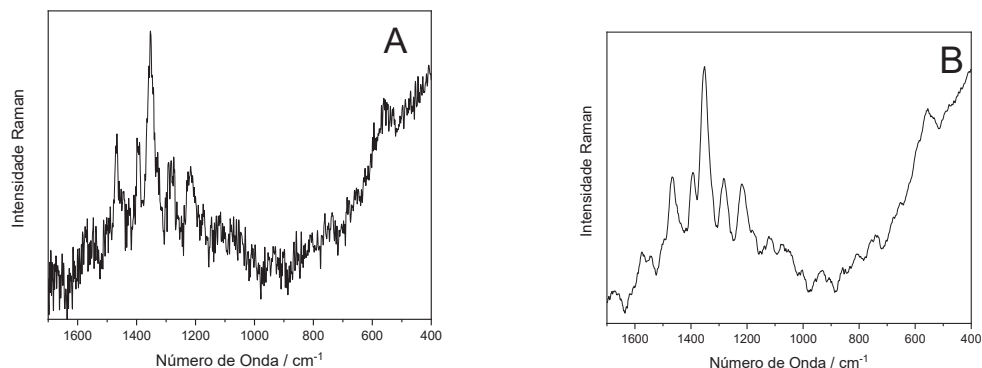
O espectro Raman do Anti-FOL seco sobre placa de vidro está apresentado abaixo (Figura 49). Devido ao fundo de fluorescência, que impede a visualização do padrão espectral característico do anticorpo, foi realizada o ajuste de linha base desse espectro (Figura 50A). Além disso, como o espectro apresentou um grande ruído, foi utilizado a opção *smooth* para a diminuição deste (Figura 50B).

Figura 49 - Espectro Raman da solução de Anti-FOL gotejada sobre lâmina de vidro.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 50 - Espectro Raman da Anti-FOL após a correção da linha base (A) e o espectro Raman da solução de Anti-FOL após ajuste *smooth* (B).

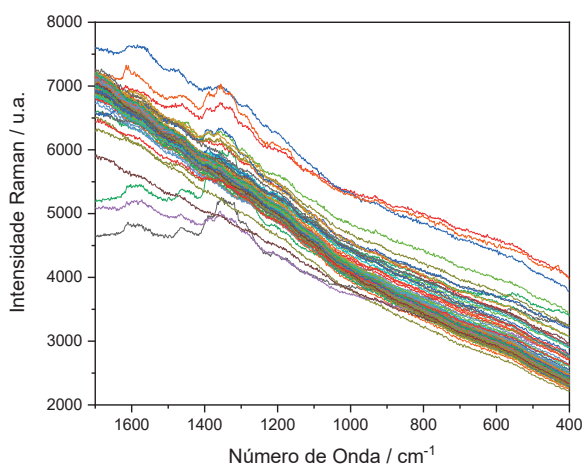


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

#### 4.2.7.2 Espectros SERS da molécula Anti-FOL adsorvida na AgNS na ausência do ME

Nos resultados abaixo, temos as figuras referentes ao mapeamento SERS do Anti-FOL sobre a superfície nanoestruturada de prata obtidos pelo método 1 (Figura 51).

Figura 51- Mapeamento SERS contendo 100 espectros do Anti-FOL adsorvido na AgNS.

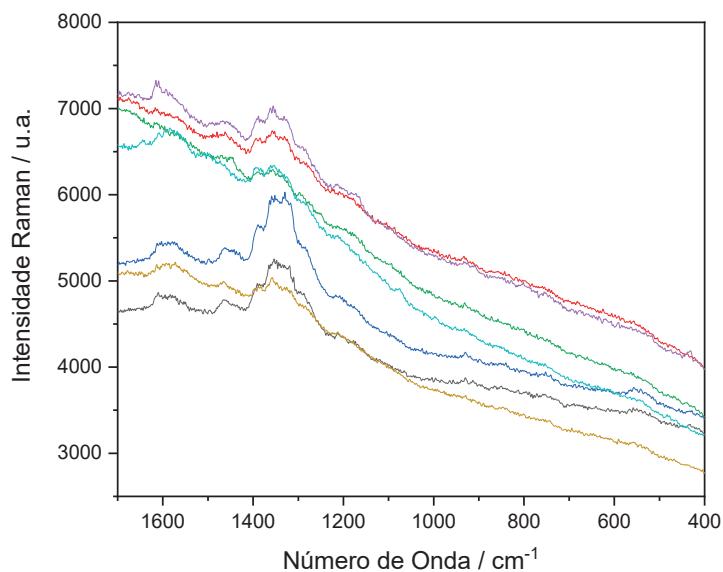


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A partir do mapeamento, notou-se a presença dos padrões citados no item 4.2.4.2., e além disso, observou-se nos espectros presente no mapeamento uma baixa reprodutibilidade, ou seja, os espectros além de diferentes entre si e, apresentaram bandas muito largas e pouco

definidas. Dessa forma, foram selecionados 7 espectros os quais foi possível observar uma similaridade espectral entre si (Figura 52).

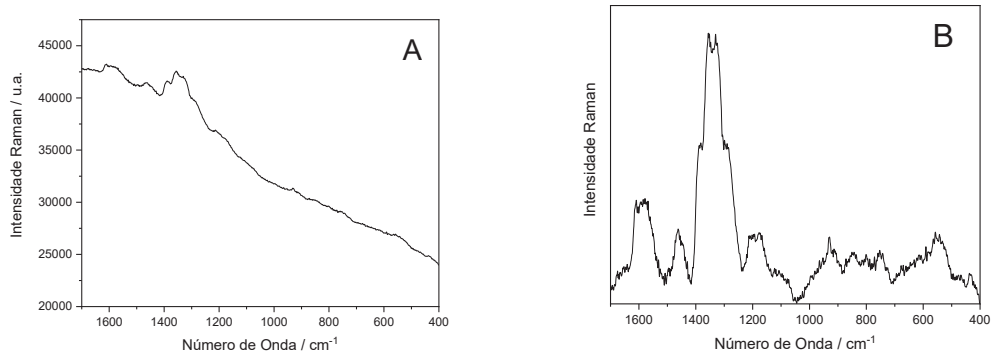
Figura 52 - Seleção de 7 espectros presentes no mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-FOL adsorvida na AgNS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Como os espectros estão bastante diferentes entre si, optou-se de realizar um somatório desses espectros, com o intuito de se obter uma “média” das geometrias de adsorções, para que no final fosse obtido um espectro capaz de ser comparado com outros espectros (Figura 53). Após somar esses 7 espectros (A), se fez necessário corrigir a linha base para que fosse possível visualizar melhor as bandas características da Anti-FOL (B).

Figura 53 - Espectro média dos 7 espectros (A) e espectro média dos 7 espectros após correção da linha base (B).

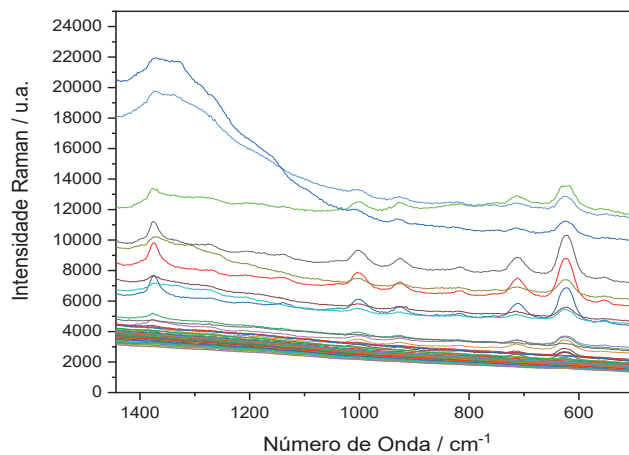


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

#### 4.2.7.3 Espectros SERS da molécula Anti-FOL adsorvida na AgNS na presença do ME

Nos resultados abaixo, tem-se as figuras referentes ao mapeamento SERS da superfície nanoestruturada de prata obtidos pelo método 2 (Figura 54).

Figura 54 - Mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-FOL adsorvido na AgNS na presença do ME.



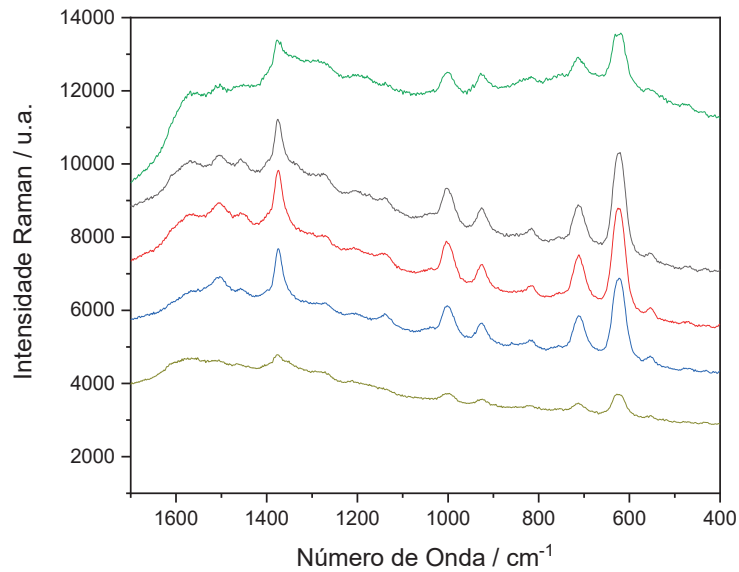
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A partir do mapeamento, notou-se a presença dos padrões citados no item 4.2.4.2., e além disso, observa-se nos espectros presente no mapeamento uma boa reprodutibilidade, ou



seja, os espectros são muito parecidos entre si. Dessa forma, foram selecionados 5 espectros os quais apareceram o maior número de bandas (Figura 55).

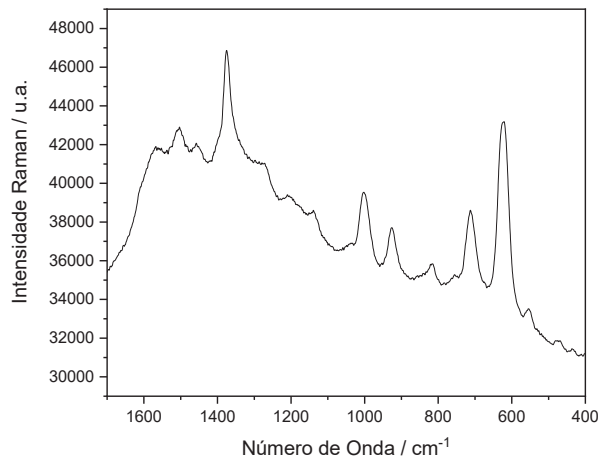
Figura 55 - Seleção de 5 espectros presentes no mapeamento SERS contendo 100 espectros da Anti-FOL adsorvido na AgNS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Como os espectros estão muito parecidos entre si, optou-se de realizar um somatório desses espectros (Figura 56), com o intuito de se obter um espectro soma e assim diminuir o ruído espectral, para que no final obtivesse um espectro capaz de ser comparado com outros espectros.

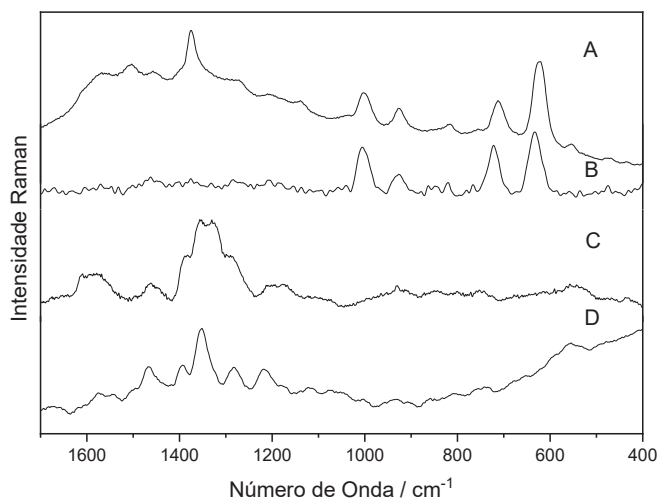
Figura 56 - Espectro soma dos 5 espectros selecionados do mapeamento realizado.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Com isso, pode-se comparar os três espectros obtidos (Figura 57): espectro soma (A), o espectro SERS do ME (B), espectro média com linha base corrigida (C), e o espectro Raman com linha base corrigida (D), para assim, realizar uma tentativa de atribuição de bandas.

Figura 57 - Espectro SERS do Anti-FOL na presença do ME adsorvido na AgNS (A), espectro SERS do ME adsorvido na AgNS (B), espectro SERS do Anti-FOL adsorvido na AgNS na ausência do ME (C) e o espectro Raman do Anti-Fol (D).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

De acordo com os trabalhos de ARÊAS & KAWANO (1991), GNIADÉCKA *et al.*, (1998) e ZHANG *et al.*, (2008) foi realizada a tentativa de atribuição de bandas.

As bandas no espectro Raman 555, 1390, 1464 e 1565  $\text{cm}^{-1}$  (D) são atribuídas aos modos vibracionais do estiramento enxofre – enxofre, a presença do aminoácido tirosina, estiramento  $\text{CH}_2$  referente a presença do aminoácido triptofano e ao estiramento do anel dos aminoácidos tirosina e triptofano, respectivamente, tiveram aumento na intensidade relativa como observado no espectro SERS (A) em 553, 1374, 1498 e 1570  $\text{cm}^{-1}$  e no espectro SERS (C) em 546, 1380, 1455 e 1580  $\text{cm}^{-1}$ .

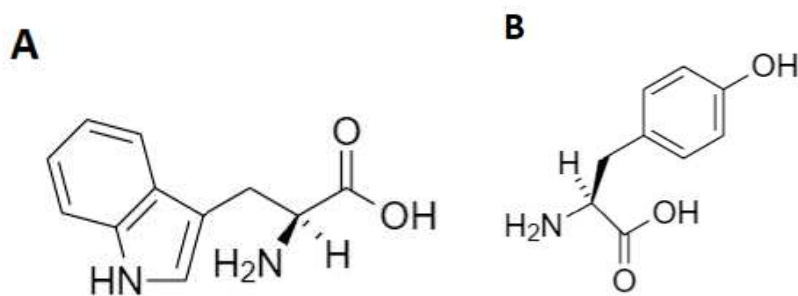
As bandas no espectro Raman 1282 e 1351  $\text{cm}^{-1}$  (D) são atribuídas aos modos vibracionais de amida III e presença do aminoácido triptofano, respectivamente, tiveram aumento na intensidade relativa como observado no espectro SERS (C) em 1285 e 1348  $\text{cm}^{-1}$ .

As bandas presentes nos espectros (A) e (B) em 629, 715, 929 e 1004 são, segundo o trabalho de Kudelski (2003) atribuídas ao estiramento carbono – enxofre devido a presença do ME.

#### 4.2.8 Observações acerca dos espectros SERS das proteínas

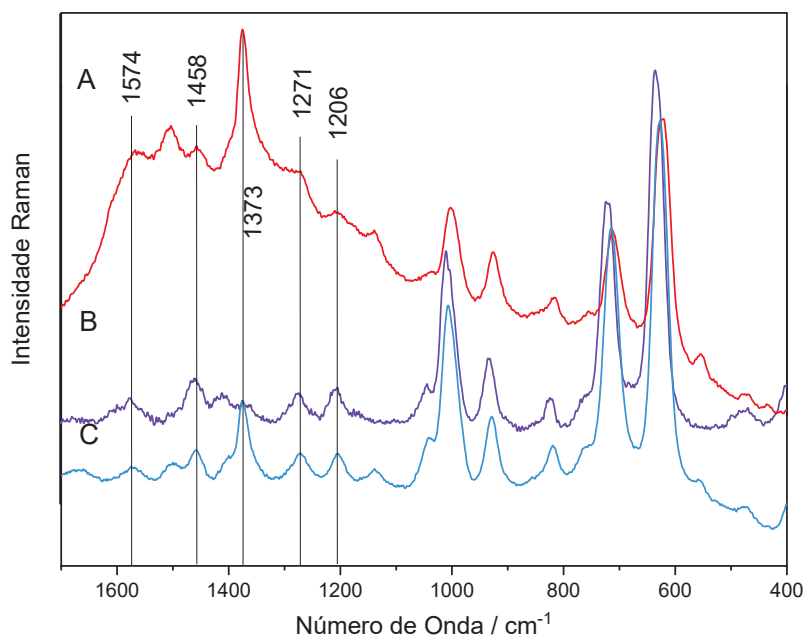
Ao comparar os espectros SERS na presença do ME das proteínas, foi possível observar uma banda presente em todos eles por volta de 1373  $\text{cm}^{-1}$ . Segundo a atribuição de acordo com os trabalhos da literatura, essa banda seria referente a presença dos aminoácidos triptofano ou tirosina. Segundo os trabalhos de HERNÁNDEZ *et al.*, (2010), ZHANG *et al.*, (2008) e FONSECA (2016), caso o aminoácido fosse o triptofano, essa banda seria referente ao estiramento do nitrogênio – carbono do anel de 5 membros, e também, o estiramento carbono – carbono do anel de 6 membros dos anéis do aminoácido triptofano (Figura 58A). No entanto, ainda segundo os mesmos trabalhos, o triptofano possui esses dois anéis que lhe proporcionam um caráter hidrofóbico onde, em meio aquoso, estes se direcionam para o interior da proteína, fazendo com que se torne menos provável a interação desse aminoácido com a superfície de prata. Com isso, pode-se dizer que seja mais provável que o aminoácido seja a tirosina (Figura 58B) pois a região do anel não é tão hidrofóbica quanto a região do triptofano fazendo com que os anéis possam interagir com a superfície de prata através da ligação de hidrogênio envolvendo as hidroxilas da tirosina e o ME e, além disso, a tirosina está em maior quantidade que o triptofano na BSA (ver Tabela 1). A comparação entre os espectros é evidenciada abaixo (Figura 59).

Figura 58 - Estrutura dos aminoácidos triptofano (A) e tirosina (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

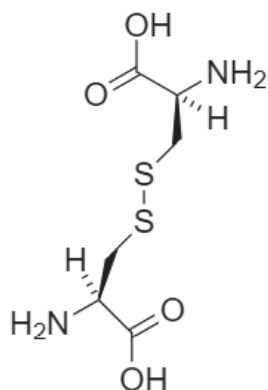
Figura 59 - Espectro SERS do Anti-FOL adsorvido na AgNS na presença do ME (A), espectro SERS da Anti-BSA adsorvida na AgNS na presença do ME (B) espectro SERS da BSA adsorvida na AgNS na presença do ME (C).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Outra importante observação foi que de acordo com o trabalho de GRABBE & BUCK (1989), as bandas observadas nos espectros SERS dessas proteínas, apresentadas na tabela 8, podem ser associadas aos estiramentos S – S referentes as pontes de dissulfeto da cistina (Figura 60), indicando assim a presença de cisteínas nas amostras de proteínas. Essa afirmação é constatada também de acordo com o trabalho de AREAS & KAWANO (1991) indicando a presença da ligação C-S do aminoácido cisteína a partir dos seguimentos CCSSCC em pontes de dissulfeto.

Figura 60 - Estrutura do aminoácido Cistina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

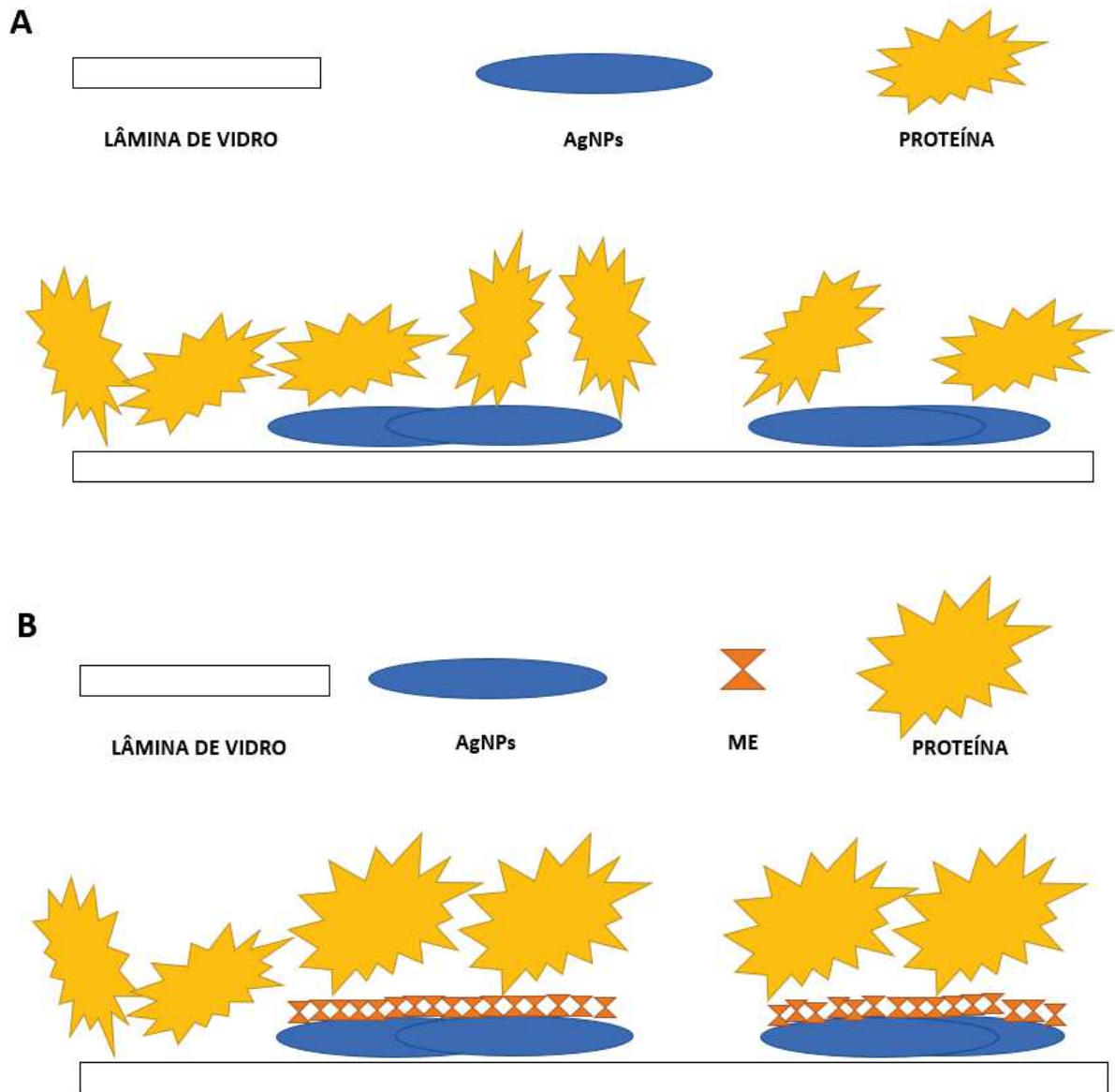
Tabela 8 - Bandas presentes nos espectros SERS (Anti-BSA, Anti-FOL e BSA).

Espectro	BSA	Anti-BSA	Anti-FOL
SERS	507 $\text{cm}^{-1}$	500 $\text{cm}^{-1}$ (Banda Larga)	544 $\text{cm}^{-1}$
SERS com (ME)	-	-	552 $\text{cm}^{-1}$

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Por fim, os resultados indicaram boa reprodutibilidade do padrão espectral nos espectros SERS das proteínas investigadas, observada nos mapeamentos com a presença do ME, indicando assim a eficiência da mercaptana para a interação da macromolécula com a superfície metálica. Nos mapeamentos com a ausência da mercaptana, notou-se um conjunto maior de espectros distintos entre isso, indicando uma variabilidade de interações entre a superfície metálica e as proteínas. Abaixo (Figura 61) tem-se a tentativa de representação das superfícies nanoestruturadas construídas com e sem o modificador de superfície ME:

Figura 61 - Tentativa de representação das superfícies nanoestruturadas construídas na ausência (A) e na presença (B) do ME.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

## 5 CONCLUSÃO

A partir da realização deste trabalho foi possível compreender melhor a maneira das interações das proteínas com as superfícies nanoestruturadas, desde as moléculas mais simples como de aminoácidos até as mais complexas como as proteínas.

Este trabalho teve como resultados importantes:

- a) a variabilidade das condições sintéticas que resultaram numa variedade de tamanhos de AgNPs não interferiram na maneira a qual as proteínas interagiram com as superfícies nanoestruturadas, pois uma vez que os reagentes são os mesmos, a química de superfície é a mesma;
- b) a construção das AgNS se mostrou simples, sem que houvesse um pré-tratamento com uma metodologia arrojada e complexa;
- c) as superfícies nanoestruturadas de prata se mostraram heterogêneas, ou seja, as nanopartículas não foram dispersas na superfície do vidro de maneira igualmente distribuída;
- d) as AgNS apresentaram uma boa atividade SERS para as moléculas do CV, MET, CAR, ME, BSA, Anti-BSA e Anti-FOL.

## REFERÊNCIAS

- ARÊAS, P. G. E.; KAWANO, Y. Aplicações de técnicas espectroscópicas vibracionais ao estudo conformacional de proteínas. **Química Nova**, São Paulo, v.14, n.1, p. 31-43, 1991.
- AROCA, R. **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- ANDRUSHCHENKO, V.; MATEJKA, P.; ANDERSON, D. T.; KAMINSKY, J.; HORNÍCEK, J.; PAULSON, L. O.; BOUR, P. Solvent Dependence of the N-Methylacetamide Structure and Force Field. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 35, p. 9727–9736, 2009.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BETEMPS, D. L.; FACHINELLO, J. C.; GALARÇA, S. P. Visible spectroscopy and near infrared (Vis/NIR), in assessing the quality of mangoes Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPEC. ISSUE 1, p. 306–313, 2011.
- BRASIL, M. S. L.; FILGUEIRAS, A. L.; CAMPOS, M. B.; NEVES, M. S. L.; EUGÊNIO, M.; SENA, L. A.; SANT'ANNA, C. B.; DA SILVA, V. L.; DINIZ, C. G.; SANT'ANA, A. C. Synergism in the antibacterial action of ternary mixtures involving silver nanoparticles, chitosan and antibiotics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 2026–2033, 2018.
- CAO, J.; GALBRAITH, E. K.; SUN, T.; GRATTAN, K. T. V. Effective surface modification of gold nanorods for localized surface plasmon resonance-based biosensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 169, p. 360–367, 2012.
- CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, n. C, p. 153–176, 1994.
- CARVALHO, Dhieniffer Ferreira de. **Estudo da Interação de biomoléculas com superfícies metálicas por espectroscopia SERS**. 2012 Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.
- COSTA, J. C. S.; ANDO, R. A.; CAMARGO, P. H. C.; CORIO, P. Understanding the effect of adsorption geometry over substrate selectivity in the surface-enhanced raman scattering spectra of simazine and atrazine. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 10, p. 4184–4190, 2011.
- CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, v. 75, p. 790–798, 1979.
- CRYSTAL STRUCTURE OF BOVINE SERUM ALBUMIN. In: PROTEIN DATA BANK, 2013. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/4F5S>. Acesso em: 05 jan. 2022.



DHAMELINCOURT, P; RAMÍREZ, F. J. Polarized Micro-Raman and Fourier Transform Infrared Spectra of L-Glutamic Acid. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 22, p. 577-582, 1991.

DI PAOLA, R.; IMPELLIZZERI, D.; SALINARO, A. T.; MAZZON, E.; BELLIA, F.; CAVALLARO, M.; CORNELIUS, C.; VECCHIO, G.; CALABRESE, V.; RIZZARELLI, E.; CUZZOCREA, S. Administration of carnosine in the treatment of acute spinal cord injury. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 10, p. 1478–1489, 2011.

DING, S. Y.; YOU, E. M.; QUN, Z. Q.; MOSKOVITS, M. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 13, p. 4042–4076, 2017.

DURÁN, N.; ROLIM, W. R.; DURÁN, M.; FÁVARO, W. J.; SEABRA, A. B. Nanotoxicology of silver nanoparticles: Toxicity in animals and humans. **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 206–213, 2019.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 319–323, 1997.

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

FAZIO, B.; D'ANDREA, C.; FOTI, A.; MESSINA, E.; IRRERA, A.; DONATO, M. G.; VILLARI, V.; MICALI, N.; MARAGÓ, O. M.; GUCCIARDI, P. SERS detection of Biomolecules at Physiological pH via aggregation of Gold Nanorods mediated by Optical Forces and Plasmonic Heating. **Scientific Reports**, v. 6, n. May 2015, p. 1–13, 2016.

FENG, C.; TANG, L.; DENG, Y.; WANG, J.; OUYANG, X.; CHEN, Z.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J. Maintaining stable LSPR performance of W18O49 by protecting its oxygen vacancy: A novel strategy for achieving durable sunlight driven photocatalysis. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 276, n. May 2020, p. 119167, 2020.

FONSECA, Bruno Guilherme da. **Estudo da Interação entre Peptídeos Derivados de Triptofano e Nanopartículas Metálicas**. 2016 Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

GNIADECKA, M.; NIELSEN, O. F.; CHRISTENSEN, D. H.; WULF, H. C. Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 4, p. 393–398, 1998.

GOESMANN, H.; FELDMANN, C. Nanoparticulate functional materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 8, p. 1362–1395, 2010.

GRABBE, E. S.; BUCK, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Investigation of Human Immunoglobulin G Adsorbed on a Silver Electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 22, p. 8362–8366, 1989.

GRAFF, M.; BUKOWSKA, J. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy of

enantiomeric and racemic methionine on a silver electrode-evidence for chiral discrimination in interactions between adsorbed molecules. **Chemical Physics Letters**, v. 509, n. 1–3, p. 58–61, 2011.

HAN, X. X.; GIA, HY.; WANG, YF.; LU, ZC.; WANG, CX.; XU, WQ.; ZHAO, B.; OZAKI, Y. Analytical technique for label-free multi-protein detection based on Western blot and surface-enhanced Raman scattering. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 8, p. 2799–2804, 2008.

HERNÁNDEZ, B.; PFLUGER, F.; ADENIR, A.; KRUGLIK, S. G.; GHOMI, M. Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media. VIII. Amino Acids with Aromatic Side Chains: L-Phenylalanine, L-Tyrosine, and L-Tryptophan. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 46, p. 15319–15330, 2010.

HIRAYAMA, K.; AKASHI, S.; FURUYA, M.; FUKUHARA, K-I. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ensims and frit-fab LC/MS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, n. 2, p. 639–646, 1990.

HUH, Y. S.; ERICKSON, D. Aptamer based surface enhanced Raman scattering detection of vasopressin using multilayer nanotube arrays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 1240–1243, 2010.

KELLY, T. L.; GANGISHETTY, M. K.; LEE, E. K.; SCOTT, R. W. J. Plasmonic Enhancement of Dye Sensitized solar cells in the red-to-near-infrared region using triangular core-shell Ag@SiO<sub>2</sub> nanoparticles. **Applied Materials & Interfaces**, p. 11044 – 11051. 2013.

KENGNE-MOMO, R. P.; DANIEL, PH.; LAGARDE, F.; JEYACHANDRAN, Y. L.; PILARD, J. F.; DURAND-THOUAND, M. J.; THOUAND, G. Protein Interactions Investigated by the Raman Spectroscopy for Biosensor Applications. **International Journal of Spectroscopy**, v. 2012, n. i, p. 1–7, 2012.

KNEIPP, K.; KNEIPP, H.; ITZKAN, I.; DASARI, R. R.; FELD, M. S. Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman Spectroscopy. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 10, p. 2957 – 2975, 1999.

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

LE RU, E.; ETCHEGOIN, P. **Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy**. 1<sup>a</sup> edição. Amsterdam: Elsevier, 2009.

LIMA, J. A.; FREIRE, P. T. C.; MELO, F. E. A.; MENDES FILHO, J.; FISCHER, J.; HAVENITH, R. W. A.; BROER, R.; BORDALLO, H. N. Using Raman spectroscopy to understand the origin of the phase transition observed in the crystalline sulfur based amino acid l-methionine. **Vibrational Spectroscopy**, v. 65, p. 132–141, 2013.

LIN, V. J. C.; KOENIG, J. L. Raman studies of bovine serum albumin. **Biopolymers**, v. 15, n. 1, p. 203–218, 1976.

- MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.
- MALARKANI, K.; SARKAR, I.; SELVAM, S. Denaturation studies on bovine serum albumin–bile salt system: Bile salt stabilizes bovine serum albumin through hydrophobicity. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 1, p. 27–36, 2017.
- MARCHEWKA, M. K.; DROZD, M.; JANCZAK, J. Crystal and molecular structure of N-(4-nitrophenyl)- $\beta$ -alanine-Its vibrational spectra and theoretical calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, p. 758-766, 2011.
- MATSUSHIMA, J. T.; SANTOS, L. C. D.; COUTO, A. B.; BALDAN, M. R. FERREIRA, N. G. Influência do Eletrólito na eletrodeposição de nanopartículas de Cu sobre eletrodo de diamante dopado com boro. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 11-16, 2012.
- MAO, A. JIN, X.; GU, X.; WEI, X.; YANG, G. Rapid, green synthesis and surface-enhanced Raman scattering effect of single-crystal silver nanocubes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1021, p. 158–161, 2012.
- MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.
- MAYORAL, J. B.; MORENO, A. C.; MARTIN-MARTINEZ, S. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas I. **Latin-American Journal of Physics Education**, v. 8, n. 4, 2014.
- MCNAY, G.; EUSTACE, D.; SMITH, W. E.; FAULDS, K.; GRAHAM, D. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance raman scattering (SERRS): A review of applications. **Applied Spectroscopy**, v. 65, n. 8, p. 825–837, 2011.
- METHIONINE. In: DRUGBANK ONLINE. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00134>. Acesso em: 05 jan. 2022.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- NAVARRETE, J. T. L.; HERNÁNDEZ, V.; RAMÍREZ, F. J. Vibrational study of aspartic acid and glutamic acid dipeptides. **Journal of Molecular Structure**, v. 348, p. 249–252, 1995.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehinger**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NOMAN, L. O.; SANT’ANA, A. C. The control of the adsorption of bovine serum albumin on mercaptan-modified gold thin films investigated by SERS spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 204, p. 119–124, 2018.
- PEIXOTO, L.; SANTOS, J.; ANDRADE, G. Biossensores Plasmônicos Baseados Em Espalhamento Raman Intensificado Por Superfície Utilizando Nanobastões De Ouro. **Química**

**Nova**, v. 42, n. 9, p. 1044–1049, 2019.

PRATA, A. S.; SGARBIERI, V. C. Composition and physicochemical properties of two protein fractions of bovine blood serum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 964–972, 2008.

QUIROGA, A. L. B. Proteínas. **Food Ingredients Brasil**, n. 28, 2014.

RABOLT, J. F.; MOORE, W. H.; KRIMM, S. Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. 3.  $\alpha$ -Poly (L-alanine). **Macromolecules**, v. 10, n. 5, p. 1065–1074, 1977.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 563–575, 2008.

ROITT, I. M.; BURTON, D. R.; MARTIN, S. J.; DELVES, P. J. **Fundamentos de Imunologia**. 12ª edição. Porto Alegre: Guanabara Koogan, 2013.

ROMÃO, Luiz Melo. **Classificação Global Hierárquica Multirrótulo da Função de Proteínas utilizando Sistemas Classificadores**. 2012 Tese (Doutorado) – Curso de Química, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2012.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2ª edição. São Paulo: Editora UNESP, 2008.

SANT'ANA, A. C.; CORIO, P.; TEMPERINI, M. L. A. The SERS effect in trace analysis: The role of nanostructured surfaces. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 805–810, 2006.

SANT'ANA, A. C.; SANTOS, P. S.; TEMPERINI, M. L. A. The adsorption of squaric acid and its derived species on silver and gold surfaces studied by SERS. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, São Paulo, v. 571, n. 2, p. 247–254, 2004.

SCHNEID, A. C.; PEREIRA, M. B.; HOROWITZ, F.; MAULER, R. S.; MATTE, C. R.; KLEIN, M. P.; HERTZ, P. F.; COSTA, T. M. H.; DE MENEZES, E. W.; BERVENUTTI, E. V. Silver nanoparticle thin films deposited on glass surface using an ionic silsesquioxane as stabilizer and as crosslinking agent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Porto Alegre, v. 26, n. 5, p. 1004–1012, 2015.

SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in Immunology**, Ramat Gan, v. 4, p. 1–14, 2013.

SINGH, S. P.; IBRAHIM, O.; BYME, H. J.; MIKKONEN, J. W.; KOISTINEN, A. P.; KULLAA, A. M.; LYNG, F. M. Recent advances in optical diagnosis of oral cancers: Review and future perspectives. **Head & Neck**, Kuopio, p. 2403 – 2411, 2015.

TATULIAN, S. A. Structural characterization of membrane proteins and peptides by FTIR and ATR-FTIR spectroscopy. In: CLIFTON, N. J. **Lipid-protein Interactions: Methods and**

**Protocols, Methods in Molecular Biology**: ed. Springer, vol. 974, p. 177 – 218.

TAVARES, G. M. Proteínas do soro de leite: aspectos físico-químicos e estruturais. In: DE CARVALHO, A. F.; PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; TAVARES, G. M.; RENHE, I. R. T. (org.). **Química e tecnologia do soro de leite**. 1. ed. Juiz de Fora: Innóvite, 2020. p. 19–29.

THOMAS, S.; BISWAS, N.; MALKAR, V. V.; MUKHERJEE, T.; KAPOOR, S. Studies on adsorption of carnosine on silver nanoparticles by SERS. **Chemical Physics Letters**, v. 491, n. 1–3, p. 59–64, 2010.

TORTONDA, F. R.; PASCUAL-AHUIR, J. L.; SILLA, E.; TUNÓN, I.; RAMÍREZ, F. J. Aminoacid zwitterions in solution: Geometric, energetic, and vibrational analysis using density functional theory-continuum model calculations. **The Journal of Chemical Physics**, v. 109, n. 2, 1998.

TSUJI, M.; GOMI, S.; MAEDA, Y.; MATSUNAGA, M.; HIKINO, S.; UTO, K.; TSUJI, T.; KAWAZUMI, H. Rapid transformation from spherical nanoparticles, nanorods, cubes, or bipyramids to triangular prisms of silver with PVP, citrate, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Langmuir**, v. 28, n. 24, p. 8845–8861, 2012.

WANG, C. C.; LUCONI, M. O.; MAIS, A. N.; FERNÁNDEZ, L. P. Derivatized silver nanoparticles as sensor for ultra-trace nitrate determination based on light scattering phenomenon. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 1238–1243, 2009.

WANG, Q.; YU, H.; ZHONG, L.; LIU, J.; SUN, J.; SHEN, J. Incorporation of silver ions into ultrathin titanium phosphate films: In situ reduction to prepare silver nanoparticles and their antibacterial activity. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 7, p. 1988–1994, 2006.

WILLETS, K. A.; VAN DUYN, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, p. 267–297, 2007.

YAQOOB, A. A.; UMAR, K.; IBRAHIM, M. N. M. Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 10, n. 5, p. 1369–1378, 2020.

ZHANG, M. L.; YI, C-Q.; FAN, X.; PENG, K-Q.; WONG, N-B.; YANG, M-S.; ZHANG, R-Q.; LEE, S-T. A surface-enhanced Raman spectroscopy substrate for highly sensitive label-free immunoassay. **Applied Physics Letters**, v. 92, n. 4, 2008.

ZHANG, Q.; GE, J.; PHAM, T.; GOEBL, J.; HU, Y.; LU, Z.; YIN, Y. Reconstruction of silver nanoplates by UV irradiation: Tailored optical properties and enhanced stability. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 19, p. 3516–3519, 2009.