

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

**Bruno Guilherme da Fonseca**

**Estudo da Interação entre Peptídeos Derivados de Triptofano e  
Nanopartículas Metálicas**

**Juiz de Fora**  
**2016**

**Bruno Guilherme da Fonseca**

**Estudo da Interação entre Peptídeos Derivados de Triptofano e  
Nanopartículas Metálicas**

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

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

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Amaral Leitão.

**Juiz de Fora**

**2016**

Dedico este trabalho aos meus pais, Hugo e Terezinha, e ao meu irmão, Hugo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me oferecer tanto, merecendo tão pouco.

À minha família, pela inspiração e pela crença no meu potencial.

À Profa. Dra. Rosana Colombara, por ter me indicado para uma oportunidade de iniciação científica em 2010, sem a qual nada disso teria acontecido.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Sant'Ana, pela vontade em ensinar, atenção e paciência dedicados ao longo de 5 anos de trabalho. Ao mesmo tempo, um pesquisador e um formador de opinião igualmente crítico e competente.

Ao Prof. Dr. Alexandre Amaral Leitão, por ter me permitido ampliar meus horizontes na pesquisa e por ter sido não só um coorientador, mas um segundo orientador.

Ao Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade e à Profa. Dra. Celly Mieko Shinohara Izumi, pela criticidade e conselhos que acrescentaram e muito a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Santiago Sanchez-Cortes, pelo interesse e contribuições significativas ao trabalho, apesar do pouco tempo que estive em Juiz de Fora.

Ao grupo do LabNano pela discussão, sugestões, companheirismo e amizade durante todo este tempo.

Ao GFQSI, pela boa vontade em ajudar alguém que não tinha nenhuma familiaridade com as ferramentas dominadas por eles.

Aos colaboradores do INMETRO, pelo treinamento em microscopia eletrônica, pelo aceite na escola de nanomateriais, bem como pelas medidas de microscopia realizadas.

A todos os amigos, espalhados não só pelo Brasil, mas pelo mundo inteiro.

“Let me sketch a conversation I have had on various occasions—in one form or another—at dinner parties and on airplanes. The person next to me says, “What do you do?” I answer “I’m a chemist.” S/he responds: “Chemistry was the one course in high school I flunked. What is it that chemists do, anyway?” I have tried two types of answers. One is: “Well, we make drugs. Like statins. Very useful. They are inhibitors of a protein called HMGCoA reductase, and they help to control cholesterol biosynthesis and limit cardiovascular disease.” (This answer usually ends the conversation) the second is:

“We change the way you live and die.” The second works better.”

(Whitesides, G. M. Reinventing Chemistry *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 3196-3209)

## RESUMO

Neste trabalho investigou-se a adsorção do triptofano (Trp), seus derivados e do 2-mercaptoetanol (MET) na superfície de nanopartículas metálica de prata ou ouro. Utilizou-se como ferramentas para o estudo, as técnicas espectroscópicas de absorção no ultravioleta e visível (UV-VIS), espalhamento Raman normal e intensificado pela superfície (*surface-enhanced Raman scattering* – SERS) e cálculos teóricos baseados na teoria do funcional da densidade (*density functional theory* – DFT). A banda da ressonância do plásmon de superfície localizado (*localized surface plasmon resonance* – LSPR) foi monitorada nos espectros UV-VIS para a investigação das propriedades eletrônicas das nanopartículas metálicas, envolvidas nas interações com os adsorbatos e nas distribuições de tamanhos.

Foram sintetizados nanoprismas de prata estabilizados por citrato de sódio em diferentes condições de temperatura, envolvendo múltiplas etapas de crescimento e usando cobre como dopante indutor de geometria. A inclusão de pequena quantidade de cobre, em relação a prata, levou à maior formação de nanoprismas triangulares que o método original. Estas superfícies foram utilizadas nos estudos da adsorção do MET. Os nanoprismas, dopados ou não, mostraram-se inadequados para uso como substrato SERS de outros adsorbatos que não fossem mercaptanas. Sintetizou-se também nanoesferas de prata ou ouro para o estudo da adsorção do Trp e seus derivados em diferentes ambientes químicos.

Os nanoprismas foram utilizados para estudos LSPR na presença do MET em diferentes concentrações, além da obtenção do espectro SERS da molécula. Observou-se que a concentração possui papel determinante na auto-organização de uma monocamada molecular, fazendo com que a conformação predominante se altere na superfície metálica. Os cálculos por DFT permitiram a simulação da adsorção do MET em superfície (111) de prata e obtenção de resultados relacionados às estruturas e estabilidades dos confôrmeros. Teoria e experimento mostraram-se em acordo dentro das condições estudadas e permitindo inferir que a ligação de hidrogênio possui um papel chave nas propriedades da monocamada.

Estudou-se a adsorção dos isômeros L-Trp e D-Trp e dos peptídeos Ala-Trp, Trp-Gly, pGlu-Lys-Trp-Ala-Pro e Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu através das espectroscopias SERS e UV-VIS. Em prata, os espectros mostraram que os aminoácidos e os dipeptídeos adsorvem preferencialmente através dos grupos carboxilato e amina. Em ouro, a análise espectral permitiu identificar a adsorção das moléculas de Trp via nitrogênio do anel indólico. Os espectros foram obtidos em concentração de  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> nos diferentes metais, contudo a adição de HCl permitiu a obtenção de espectros em  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. As diferenças entre os espectros em ouro permitiram concluir que o Trp interage mais intensamente com a superfície na presença de HCl. A partir

de todos os resultados obtidos, pode-se sugerir que as nanopartículas de ouro mostram-se úteis para o estudo de estruturas mais complexas por diferencia o triptofano adsorvido à superfície de outros presentes na estrutura de interesse.

Palavras-Chave: Prata. Ouro. Nanoprisma. L-Trp. Triptofano. 2-Mercaptoetanol. SERS. DFT.

## ABSTRACT

The adsorption of tryptophan (Trp), his derivatives and 2-mercaptoethanol (MET) on metallic nanoparticle surface had been studied on this thesis. For such investigations it was employed the following tools: ultraviolet and visible absorption spectroscopy (UV-VIS), Raman scattering spectroscopy, surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and density functional theory. The localized surface plasmon resonance (LSPR) band was monitored on UV-VIS spectra to study the electronic properties of metallic nanoparticles involved in the interactions with the adsorbates and the size distributions.

Silver nanoplates were synthesized in different conditions of temperature, multiple growing steps and using copper as a stabilizing doping. A small addition of copper, compared to silver, increased the triangular nanoprism yield of the original synthesis. These nanoparticles were used for adsorption study of MET. It was synthesized gold and silver nanospheres for studying Trp adsorption and other peptides on different chemical surroundings.

The nanoprisms were utilized for LSPR study in the presence of MET at different concentrations, in addition to SERS spectra of this molecule. It has been observed the molecule concentration has a key role for self-assembled monolayer formation, which changes the most common conformer on the metallic surface. DFT calculation allowed us to simulate MET adsorption on silver surface (111) obtaining results related to the structures and stabilities of the conformers. Theory and experiment showed in agreement in the conditions studied and conclude the hydrogen bond is a key player in the monolayer properties.

It was studied the adsorption of the isomers, L-Trp and D-Trp, and the peptides, Ala-Trp, Trp-Gly, pGlu-Lys-Trp-Ala-Pro and Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu, through SERS spectroscopy. In silver, the spectra showed amino acids and dipeptides tend to adsorb by the acid and amine group. In gold, an enhancement and shifting of the bands allowed us to identify the adsorption by the indole ring, specifically by the nitrogen atom. The spectra were obtained at concentration of  $10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$  on different metals, however in presence of HCl the molecular concentration was  $10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$ . When HCl was added, the spectra showed a slightly different pattern, which suggest us that, in this condition, Trp interacts stronger to the surface.

Keywords: Silver. Gold. Nanoparticles. Nanoprism. L-Trp. Tryptophan. Peptides. 2-Mercaptoethanol. SERS. DFT.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fator de qualidade de diferentes metais. ....	18
Figura 2 – Ilustração dos orbitais moleculares e da banda de valência da nanoestrutura. ....	23
Figura 3 –Diagrama para representação dos orbitais.....	24
Figura 4–Superfície (111) de ouro e os possíveis sítios de adsorção. ....	26
Figura 5–Mapa tridimensional da energia de adsorção do SCH <sub>3</sub> .....	27
Figura 6 – Espectros UV-VIS dos coloides AgNP1, AgNP2(PVP) e AgNP3(Gelo). ....	39
Figura 7 –Micrografia do coloide AgNP1.....	41
Figura 8–Espectros UV-VIS dos coloides AgNP4, 5, 6 e 7.....	42
Figura 9 – Espectros UV-VIS do coloide AgNP8 recém preparado e após um mês armazenado. .....	44
Figura 10 – Espectro SERS da MPy (10 <sup>-5</sup> M) em AgNP8. ....	45
Figura 11 – Espectros Raman e SERS do MET. ....	46
Figura 12 – Espectros Raman e SERS do MET na região entre 800 e 500 cm <sup>-1</sup> . ....	47
Figura 13 – Espectros UV-VIS da AgNP8 em presença de MET sob diferentes concentrações .....	48
Figura 14 – Visão lateral da adsorção do MET (gauche). ....	49
Figura 15 – Visão superior da adsorção do MET (gauche). ....	49
Figura 16 – Visão lateral da adsorção do MET (trans).....	50
Figura 17 – Visão superior da adsorção do MET (trans). ....	51
Figura 18 – Espectros UV-VIS da lâmina de vidro, do coloide e da lâmina modificada.....	53
Figura 19 – Espectros SERS da MPy (1.10 <sup>-5</sup> M) em filme fino de prata de diferentes pontos do substrato.....	54
Figura 20 – Espectros UV-VIS da AgNP8 em presença de D-Trp (10 <sup>-3</sup> M).....	55
Figura 21 – Espectros UV-VIS do AgNP1 na presença de KCl (5.10 <sup>-2</sup> M).....	56
Figura 22 – Espectros UV-VIS do AgNP1 na presença de KCl (5.10 <sup>-3</sup> M).....	57
Figura 23 – Espectro UV-VIS do coloide AgCuNP.....	58
Figura 24 – Micrografia do AgCuNP. ....	59
Figura 25 – Espectro SERS da MPy (10 <sup>-4</sup> M) em AgCuNP.....	60
Figura 26 – Representação do Triptofano e comparação entre os isômeros. ....	60
Figura 27 – Espectro Raman do D-Trp em estado sólido. ....	61
Figura 28 – Espectro Raman do L-Trp em estado sólido. ....	62
Figura 29 – Espectro LSPR do coloide AgNPC.....	63

Figura 30 – Micrografia do coloide AgNPC. ....	64
Figura 31 – Espectros LSPR da AgNPC em presença de D-Trp .....	65
Figura 32 – Espectros LSPR do coloide AgNPC em presença de L-Trp. ....	66
Figura 33 – Espectro SERS do D-Trp na presença de AgNPC. ....	67
Figura 34 – Espectros LSPR do coloide AuNP na presença de L-Trp. ....	68
Figura 35 – Espectro SERS do D-Trp em presença de nanopartículas de ouro. ....	69
Figura 36 – Espectro SERS do L-Trp $10^{-3}$ M em presença de AuNP. ....	70
Figura 37 – Espectros LSPR de AuNP em presença de L-Trp $10^{-5}$ M e HCl $10^{-3}$ M. ....	71
Figura 38 – Espectro SERS em ouro do L-Trp $10^{-5}$ M em presença de HCl $10^{-3}$ M. ....	72
Figura 39 – Espectros LSPR do coloide AuNP em presença de HCl $10^{-3}$ M. ....	73
Figura 40 – Espectros SERS em ouro do L-Trp $10^{-5}$ M em presença de HCl $10^{-3}$ M. ....	74
Figura 41 – Representação da molécula Ala-Trp. ....	75
Figura 42 – Espectros LSPR de AgNPC em presença de Ala-Trp $10^{-3}$ M. ....	76
Figura 43 – Espectros LSPR de AuNP em presença de Ala-Trp $10^{-3}$ M. ....	77
Figura 44 – Espectro Raman da Ala-Trp em estado sólido. ....	78
Figura 45 – Espectro SERS da Ala-Trp $10^{-3}$ M em prata. ....	79
Figura 46 – Espectro SERS da Ala-Trp $10^{-3}$ M em ouro. ....	80
Figura 47 – Espectro SERS em ouro da Ala-Trp $10^{-5}$ M na presença de HCl $10^{-3}$ M. ....	81
Figura 48 – Representação do dipeptídeo Trp-Gly .....	82
Figura 49 – Espectros LSPR do AgNPC em presença de Trp-Gly $10^{-3}$ M. ....	83
Figura 50 – Espectros LSPR de nanopartículas de ouro em presença de Trp-Gly $10^{-3}$ M. ....	84
Figura 51 – Espectro Raman do dipeptídeo Trp-Gly em estado sólido. ....	85
Figura 52 – Espectro SERS de Trp-Gly $10^{-3}$ M em prata. ....	86
Figura 53 – Espectro SERS de Trp-Gly $10^{-3}$ M em ouro. ....	87
Figura 54 – Espectro SERS em ouro do Trp-Gly $10^{-5}$ M na presença de HCl $10^{-3}$ M. ....	88
Figura 55 – Ilustração da estrutura do P5. ....	90
Figura 56 – Espectro Raman do P5 em estado sólido. ....	90
Figura 57 - Espectro SERS do P5 ( $10^{-5}$ M) em prata. ....	91
Figura 58 – Espectro SERS em ouro do P5 $10^{-6}$ M em presença de HCl $10^{-3}$ M. ....	92
Figura 59 – Representação ilustrativa do P6. ....	93
Figura 60 – Espectro Raman do P6 em estado sólido. ....	94
Figura 61 - Espectro SERS do P6 ( $10^{-6}$ M) em prata. ....	95
Figura 62 – Espectro SERS do P6 em ouro na presença de HCl $10^{-3}$ M. ....	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de distância e ângulos da molécula adsorvida. ....	51
Tabela 2 – Energia de adsorção da molécula à superfície (111). ....	52
Tabela 3 – Atribuição dos espectros SERS e Raman do D-Trp e do L-Trp. ....	74
Tabela 4 – Atribuição dos espectros Raman e SERS da Ala-Trp. ....	81
Tabela 5 – Proposta de atribuição dos espectros Raman e SERS do Trp-Gly. ....	88
Tabela 6 – Atribuição vibracional do espectro Raman e SERS do P5. ....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DFT – Density Functional Theory – Teoria do Funcional de Densidade.

LDA – *Local Density Approximation* – Aproximação da Densidade Local.

GGA - *Generalized Gradient Approximation* – Aproximação do Gradiente Generalizado.

SERS –*Surface Enhanced Raman Spectroscopy* – Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície.

LSPR – *Localized Surface Plasmon Resonance* – Ressonância do Plasmon de Superfície Localizado.

UV-VIS – Ultravioleta-Visível.

AgNP – Nanoprismas de prata.

AgCuNP – Nanoprismas de prata dopados por cobre.

AgNPC –Nanoesferas de prata.

AuNP – Nanopartículas de ouro.

APTMS – (AminoPropil)TrimetoxiSilano.

PVP – Polivinilpirrolidona.

MET – 2-mercaptoetanol.

Ala-Trp - alanina-triptofano.

Trp-Gly - triptofano-glicina.

P5 - pirroglutamina-lisina-triptofano-alanina-prolina.

P6 - triptofano-histidina-triptofano-leucina-glutamina-leucina.

MPy - 4-mercaptopiridina.

DNA – *Deoxyribonucleic acid* - Ácido Desoxiribonucleico.

min. – minutos.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1.	NANOPARTÍCULAS PLASMÔNICAS .....	15
<b>1.1.1.</b>	<b>Nanoprismas.....</b>	<b>18</b>
1.2.	RAMAN .....	19
1.3.	SERS.....	21
1.4.	MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES METÁLICAS POR MERCAPTANAS.....	24
1.5.	SERS DO TRP E DE PEPTÍDEOS .....	28
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
3.1.	EQUIPAMENTOS .....	32
3.2.	REAGENTES:.....	32
3.3.	LIMPEZA DAS VIDRARIAS .....	32
3.4.	SÍNTESE DE NANOPRISMAS DE PRATA 1, 2 e 3 (AgNP1, 2 E 3).....	33
3.5.	SÍNTESE DE AgNP's SOB TEMPERATURA CONTROLADA (AgNP 4, 5, 6 e 7).....	33
3.6.	CRESCIMENTO CONTROLADO DOS NANOPRISMAS (AgNP8) .....	34
3.7.	SÍNTESE DO COLOIDE AgNPC (NANOESFERAS) .....	34
3.8.	SÍNTESE DE NANOPRISMAS DE PRATA DOPADOS COM COBRE. (AgCuNP) 34	
3.9.	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNP) .....	35
3.10.	CONSTRUÇÃO DOS FILMES FINOS DE PRATA.....	35
3.11.	ESPECTROS UV-VIS DAS SUSPENSÕES COLOIDAI E FILMES FINOS. ....	35
3.12.	ESPECTROS UV-VIS DE AgNP8 EM PRESENÇA DE MET.....	36
3.13.	ESTUDO CINÉTICO DE ADSORÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES QUÍMICAS NA SUPERFÍCIE DAS AgNPs. ....	36
3.14.	MICROSCOPIA DAS NANOPARTÍCULAS (AgNP1, AgNPC, AgCuNP).....	36
3.15.	ESPECTROS SERS DE DIFERENTES ADSORBATOS EM SUSPENSÕES COLOIDAI E EM FILMES FINOS. ....	37

3.16.	METODOLOGIA COMPUTACIONAL .....	37
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS AgNPs .....	39
4.2.	ATIVIDADE SERS DO AgNP8 .....	44
4.3.	ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA ADSORÇÃO DO MET EM AgNP8.....	45
4.4.	ESTUDO TEÓRICO DA ADSORÇÃO DO MET EM SUPERFÍCIE 111 DE PRATA. 48	
4.5.	CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE SERS DO FILME FINO DE PRATA .....	52
4.6.	ESTUDO CINÉTICO DA INTERAÇÃO ENTRE AgNP8 E O D-Trp.....	54
4.7.	ESTUDO CINÉTICO DE AgNP1 EM PRESENÇA DE KCl .....	55
4.8.	CARACTERIZAÇÃO DO AgCuNP .....	57
4.9.	ATIVIDADE SERS DO AgCuNP .....	59
4.10.	ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO L-Trp E DO D-Trp .....	60
<b>4.10.1.</b>	<b>LSPR e SERS do Trp em AgNPC .....</b>	<b>62</b>
<b>4.10.2.</b>	<b>LSPR e SERS do Trp em AuNP .....</b>	<b>67</b>
4.11.	ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA Ala-Trp .....	75
4.12.	ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO Trp-Gly.....	82
4.13.	ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO P5.....	89
4.14.	ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO P6.....	93
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE A – Teoria do Funcional da Densidade.....</b>	<b>111</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Durante o último século, diversos avanços foram realizados em biologia e medicina a partir do estudo de microrganismos e biomoléculas como proteínas e DNA (Oh *et al.*, 2015). Tal interesse vem da consciência de que a investigação de tais estruturas pode levar ao combate e diagnóstico de diversas doenças. Um exemplo importante, dentre os diversos existentes, é o câncer. Calcula-se que esta doença cause prejuízos de cerca de 1 trilhão de dólares ao mundo todo, levando-se em consideração as perdas por morte prematura e invalidez, excluindo-se os gastos médicos com o tratamento. Atualmente, a cada ano 12,7 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer e 7,6 milhões morrem vítimas da doença. Persistindo a tendência dos últimos anos, haverá 26 milhões de novos casos e 17 milhões de mortes por ano em 2030 (Stewart e Wild, 2014). Portanto, torna-se interessante a busca por métodos de diagnóstico capazes de detectar a doença precocemente, em alguns casos pode estar relacionado com moléculas em regime de baixas concentrações. Outro aspecto importante se dá pela substituição de diversos métodos tradicionais que se mostram desvantajosos em relação a sensibilidade, seletividade, tempo de análise ou custo. Nesta busca, há diversos exemplos do uso de nanomateriais para a detecção de biomoléculas (Alivisatos, 1996; Gupta e Gupta, 2005; Phillips e Cheng, 2007; Saha *et al.*, 2012; Lee, 2014).

### 1.1. NANOPARTÍCULAS PLASMÔNICAS

Nanociência ou Nanotecnologia, é uma área que tem atraído muito interesse nos últimos anos por suas potencialidades para o desenvolvimento de novas tecnologias nas mais diversas situações. Apesar do grande crescimento de investimento em pesquisas nesta área, as nanopartículas são utilizadas há muito tempo. Há diversos exemplos de nanoestruturas ao longo da história da humanidade (Heiligtag e Niederberger, 2013). Vem do império romano um exemplo de uso decorativo de nanoestruturas de ouro, o cálice de Lycurgus (Hunt, 1976). As nanopartículas presentes na composição da estrutura vítrea promovem uma mudança de cor de verde para vermelho. A partir de condições normais de iluminação o cálice apresenta cor verde, quando a fonte de iluminação é colocada em seu interior, observa-se a coloração vermelha. Do ponto de vista acadêmico, um dos primeiros e relevantes trabalhos com nanopartículas foi feito por Faraday em 1857, no qual ele reduziu o sal de ouro (III) utilizando fósforo (Faraday, 1857).

As nanopartículas metálicas apresentam diversas características interessantes, entre elas, propriedades plasmônicas, catalíticas, condutividade elétrica e térmica e óticas (Jiang, Liu

e Sun, 2005; Gobin *et al.*, 2007; Nallathamby, Lee e Xu, 2008; Thompson *et al.*, 2008; Schoen *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011). Tais propriedades advém do pequeno tamanho e grande área superficial comparada ao pequeno volume, permitindo que o metal nanoestruturado apresente propriedades completamente diferentes daquelas apresentadas pelo metal em sua forma estendida. Para a otimização do efeito desejado, deve-se controlar a forma, composição e tamanho das nanopartículas, por isso torna-se muito importante estudar e desenvolver novas sínteses.

A maioria dos métodos para obtenção de nanopartículas envolve a redução química em líquidos. Em virtude do objetivo final do trabalho, serão enfatizados métodos que envolvam suspensões coloidais em meio aquoso. Em 1951, Turkevich *et al.* publicaram um trabalho de síntese de nanopartículas de ouro, no qual utilizou-se o ácido cítrico para redução do ácido cloroáurico à temperatura de 100 °C. Nesta síntese, o citrato participa tanto como agente redutor, quanto como estabilizante. Posteriormente, Frens aprimorou o método alterando as proporções de ouro e citrato para controlar o tamanho das partículas. (Frens, 1973) O trabalho de Frens é uma referência para a síntese de nanopartículas de ouro esféricas com tamanhos entre 10-20 nm. Enquanto isso, a prata apresenta sínteses utilizando o boroidreto de sódio como redutor, em outros casos o sal de prata é reduzido pelo citrato de sódio, síntese similar à de ouro (Creighton *et al.*, 1979; Lee e Meisel, 1982). Em todas as sínteses citadas há formação de nanopartículas esféricas.

As nanopartículas de prata e ouro tornam-se especialmente interessantes em função do plasmon de superfície, que permitem, por exemplo, a intensificação do espalhamento Raman. Os metais de cunhagem possuem diversas características típicas a eles por apresentarem elétrons livres que se movem em um fundo fixo de íons positivos, o que garante neutralidade do sistema (Le Ru e Etchegoin, 2009). Diante desta concepção, poderia ser definido como plasma, ou para ser mais preciso na descrição, como plasma de estado sólido. As propriedades óticas destes metais são obtidas a partir da interação entre seus elétrons livres e a luz. A incidência de uma radiação com energia adequada pode levar a excitação coletiva dos elétrons, a esta excitação é denominada de plasmon. De forma mais rigorosa, Pines assim define Plasmons (Pines, 1956):

*“A plasmon is therefore a quantum quasi-particle representing the elementary excitations, or modes, of the charge density oscillations in a plasma.”* (Um plasmon é portanto uma quasi-partícula quântica representando excitações elementares, ou modos, da oscilação de carga em um plasma.)

Uma comparação útil e válida para o entendimento deste conceito, ocorre entre o que o fóton representa para a luz e plasmon para a oscilação coletiva dos elétrons. O fóton é uma partícula quântica representando os modos de liberdade da oscilação do campo eletromagnético (Le Ru e Etchegoin, 2009). Outra comparação válida vem do estudo de estado sólido, onde há associação entre modos vibracionais e fônons. No caso das nanopartículas, a ressonância da frequência de luz incidente com a frequência de oscilação dos elétrons recebe o nome de ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR- *Localized Surface Plasmon Resonance*). Da mesma forma que a luz pode ser estudada a partir de uma descrição clássica, o mesmo pode ser realizado para o entendimento dos plasmons.

Em 1908, Gustav Mie resolveu as equações de Maxwell para uma partícula esférica submetida a um campo eletromagnético. Sua motivação veio da curiosidade de tentar entender o motivo da coloração de uma amostra de água contendo pequenas partículas de ouro. Tal trabalho é hoje chamado de Teoria de Mie, que descreve o espectro de extinção (termo que representa a soma das contribuições da absorção e do espalhamento) para partículas esféricas. Há de se destacar que a função dielétrica do metal, o tamanho, a forma da nanopartícula e o solvente (índice de refração do meio) são aspectos que irão determinar a posição da frequência de oscilação no espectro eletromagnético, ou ainda, o máximo da banda LSPR (Le Ru e Etchegoin, 2009).

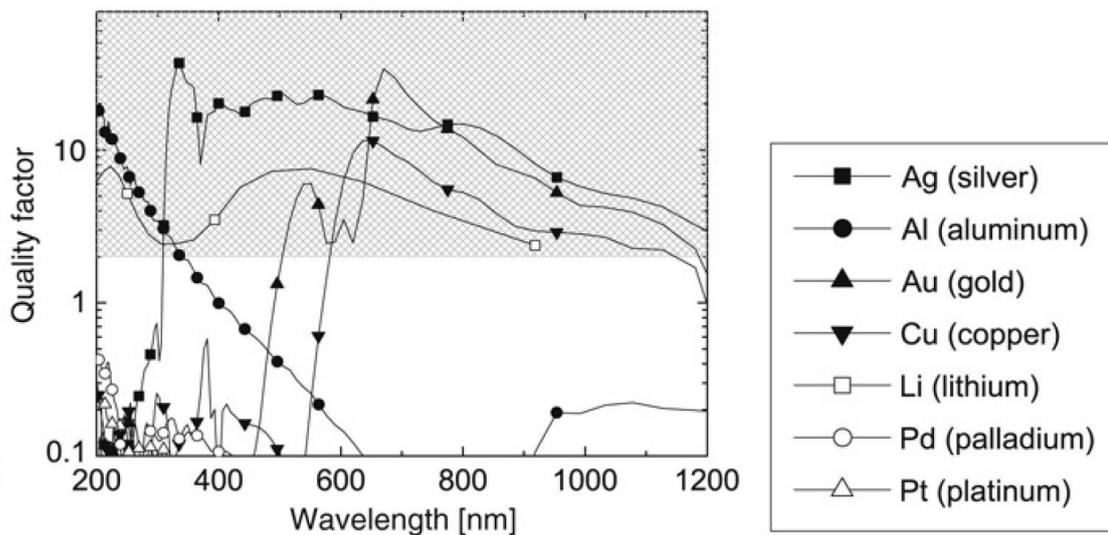
O problema de uma pequena esfera metálica interagindo com um campo eletromagnético pode ser resolvido ao se considerar que a esfera tenha um tamanho menor que o comprimento de onda incidente. A partir destas aproximações, a equação 1 descreve o campo elétrico ( $E$ ) como proporcional ao campo incidente ( $E_0$ ), sendo  $\epsilon_M$  a constante dielétrica do meio.

$$E = \frac{3\epsilon_M}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_M} E_0 \quad (1)$$

A função dielétrica do metal é descrita como a soma de uma parte real e outra imaginária, sendo que, para um metal ser bom substrato SERS, a parte real da função dielétrica deve ser negativa, enquanto a imaginária deve apresentar o menor valor possível (Le Ru e Etchegoin, 2009). Se a parte real for igual ou próxima de  $-2\epsilon_M$  levará a uma grande intensificação local do campo elétrico e assim atingir a condição de ressonância entre o plasmon e o laser incidente. Neste modelo que leve em consideração a comparação entre as partes reais e imaginária, elaborou-se um fator de qualidade SERS relacionado ao metal e o comprimento

de onda da radiação excitante. O valor deste fator de qualidade para diferentes metais na região espectral entre 200 e 1200 nm é apresentado na Figura 1. A região sombreada (hachurada) indica região com fator de qualidade igual ou maior que dois, tal condição indica que o metal seja adequado para obtenção do espectro SERS. Pode-se ainda observar que diversos metais apresentam a possibilidade de obtenção de espectro na região analisada. Entre 200 e 400 nm destaca-se o alumínio, o lítio poderia ser utilizado até 900 nm, a prata a partir de 300 nm, o ouro de 500 nm em diante e o cobre a partir de 600 nm. Desta forma, torna-se claro entender o porquê do uso de prata, ouro e cobre para construção de substrato SERS na região espectral de luz visível.

Figura 1 – Fator de qualidade de diferentes metais.



Legenda: Valores calculados para o fator de qualidade de diferentes metais na região espectral entre 200 e 1200 nm.

Fonte: (Le Ru e Etchegoin, 2009)

### 1.1.1. Nanoprismas

Entre os diversos tipos de nanopartículas de prata, o nanoprisma apresenta propriedades plasmônicas que podem ser adaptadas em toda a região do visível e infravermelho próximo, além de apresentar aplicações promissoras para catálises, sensores e biomedicina (Sun e Xia, 2003; Zhang *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2012). O primeiro trabalho de síntese de nanoprismas de prata foi publicado por Jin *et al.* em 2001, no qual eles reduziram a prata através de um método fotoquímico. Em 2005, Métraux e Mirkin propuseram um novo

método de síntese, a partir da mistura de nitrato de prata, boroidreto de sódio, polivinilpirrolidona (PVP), citrato de sódio, e peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente.

Em 2003, Kelly *et al.* simularam nanopartículas de prata de diferentes tamanhos e formatos através da aproximação de dipolo discreto. Neste trabalho, eles simulam a excitação de uma única esfera de prata com radiação em 369 nm e observam a intensificação do campo elétrico nas proximidades da partícula em 50 vezes. Enquanto isso, um nanoprisma triangular com 100 nm, é excitado em 770 nm e intensifica 500 vezes o campo elétrico na ponta do triângulo. Do ponto de vista da espectroscopia SERS, quanto maior a intensificação do campo elétrico local, melhor o substrato. Pesa contra os prismas triangulares o fato da maior intensificação do campo ocorrer em uma região superficial muito menor quando comparada às esferas.

Desde então, diversos métodos para a produção de nanoprismas tem surgido na literatura, os quais podem ser divididos entre métodos fotoquímicos e métodos térmicos (também chamados de métodos por redução química). Kilin *et al.* (2008) realizaram cálculos de estrutura eletrônica, os quais indicaram que o ácido cítrico adsorvia na superfície (111) mais intensamente do que na superfície (100). Outra informação importante foi evidenciar que o grupo carboxílico era o responsável pela preferência da superfície (111). Em 2012, Tsuji *et al.* demonstraram que tão importante quanto sua afinidade pela superfície (111), era sua capacidade de proteger esta região da ação oxidante do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Eles demonstraram tal função através da oxidação de nanopartículas de prata (esferas, bastões, cubos e bipirâmides) que levaram a posterior formação de primas. Em 2014, Yu *et al.* reportaram em seu trabalho que este método de redução química é essencialmente uma síntese fotoquímica modificada pelas propriedades do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, mostrou também que, tanto a luz, quanto o oxigênio dissolvido são essenciais para a síntese, enquanto o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> torna o tempo para formação de nanoprismas muito menor.

## 1.2. RAMAN

O fenômeno de espalhamento Raman foi observado pela primeira vez pelo indiano Chandrasekhara Venkata Raman em 1928 (Raman e Krishnan, 1928). Este espalhamento é gerado a partir de uma fonte que pode (ressonância) ou não levar a molécula para um estado excitado. A partir disso, a maior parte das moléculas irá emitir um fóton de mesma energia e voltar ao estado eletrônico e vibracional original, por outro lado, uma pequena parte das

moléculas irá voltar para o nível eletrônico fundamental, porém de energia vibracional mais elevado e, por isso, emitirá um fóton com energia menor que a do fóton incidente, caracterizando assim o espalhamento inelástico Stokes. A diferença de energia entre o fóton incidente e o fóton espalhado é justamente a diferença de energia entre os níveis vibracionais da molécula. Dentre todos os processos que podem ocorrer na molécula, o espalhamento Raman tem uma eficiência muito pequena,  $10^{-30} - 10^{-25} \text{ cm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$  (Kneipp *et al.*, 1999). Ou seja, a ineficiência intrínseca do processo leva a limitações, como, por exemplo, a necessidade de altas concentrações para a obtenção do espectro de espécies em solução.

Apesar da espectroscopia de espalhamento Raman e a espectroscopia de absorção na região do Infravermelho serem espectroscopias vibracionais, ambas envolvem fenômenos diferentes, espalhamento inelástico de fótons e absorção de fótons com transições vibracionais respectivamente, e por isso regras de seleção diferentes. Na equação 2 tem-se a descrição clássica da intensidade do espalhamento Raman:

$$I_R = NI_0\sigma_R dz \quad (2)$$

Sendo N o número de moléculas em que ocorre o espalhamento Raman,  $I_0$  a intensidade da radiação incidente,  $\sigma_R$  a seção de choque Raman e  $dz$  o caminho óptico (McCreery, 2000). A forma como a expressão é enunciada permite afirmar que a intensidade está diretamente relacionada à seção de choque. A  $\sigma_R$ , por sua vez, está relacionada a  $\delta\alpha/\delta Q$ , que é a variação da polarizabilidade associada ao deslocamento da coordenada Q em torno da posição de equilíbrio. Polarizabilidade pode ser enunciada como a facilidade de ocorrer a reorganização dos elétrons na molécula sob influência de um campo elétrico externo (Le Ru e Etchegoin, 2009). A partir destas novas informações, a intensidade Raman pode ser reescrita para explicitar sua relação com o modo de vibração (Equação 3).

$$I_R = \mu(v_0 \pm v_j)^4 \mu_j^2 Q_j^2 \quad (3)$$

Onde,  $\mu$  é uma constante,  $v_0$  é a frequência da radiação excitante,  $v_j$  é a frequência da radiação espalhada,  $j$  é o número quântico vibracional do estado  $j$  e  $\mu_j$  é o momento de transição de um dipolo induzido.

A baixa seção de choque Raman faz com que sejam necessárias uma grande quantidade de moléculas no volume analisado para obtenção do espectro. Em virtude desta situação o espalhamento Raman intensificado por superfície aparece como alternativa que

permite o estudo de monocamadas moleculares adsorvidas em superfícies nanoestruturadas dos metais de cunhagem (Ag, Au e Cu) (De Faria, Temperini e Sala, 1999).

### 1.3. SERS

O espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS) foi descrito pela primeira vez na literatura por Fleischman *et al.* (1974) durante o estudo de moléculas de piridina adsorvidas em eletrodo de Prata. A intenção inicial era aumentar o número de moléculas adsorvidas através da preparação da superfície do eletrodo de Ag. Ao fazerem esta preparação, foi observado que os espectros obtidos apresentaram uma relação sinal ruído significativamente melhor. A princípio, essa melhoria foi atribuída ao aumento da área superficial, porém trabalhos posteriores mostraram que a intensificação era maior do que o seria esperado se houvesse apenas um aumento do tamanho da área superficial (Creighton, Blatchford e Albrecht, 1979). O tratamento dado ao eletrodo de prata levaria a intensificação do espectro na ordem de  $10^2$  vezes, enquanto que a intensificação observada pelo experimento atingia valores da ordem de  $10^6$  vezes. Posteriormente à descoberta, foram publicados diversos trabalhos que procuraram explicar os processos envolvidos na intensificação do espectro (Moskovits, 1982; De Faria, Temperini e Sala, 1999; Hao e Schatz, 2004; Otto, 2005; Itoh *et al.*, 2011; Mcnay *et al.*, 2011).

Dentre os diversos modelos propostos, destacam-se o eletromagnético e o químico. No primeiro, a intensificação ocorre a partir da intensificação do campo eletromagnético próximo à superfície do metal através da ressonância com o plasmon de superfície. Este fenômeno afeta tanto a radiação incidente, quanto a radiação espalhada (Douketis *et al.*, 2000). O campo elétrico pode ser intensificado em  $E^4$ ,  $E$  é o campo elétrico local, em determinadas condições (Aroca, 2006). A equação 4 mostra a relação entre a intensidade do sinal SERS ( $I_{SERS}(v_S)$ ) com o número de moléculas espalhadoras ( $N$ ), a intensidade da radiação excitante ( $I(v_L)$ ), o campo elétrico da radiação excitante ( $E(v_L)$ ), o campo elétrico da radiação espalhada ( $E(v_S)$ ) e a seção de choque Raman da molécula ( $\sigma_{ads}^R$ ).

$$I_{SERS}(v_S) = N \cdot I(v_L) |E(v_L)|^2 |E(v_S)|^2 \sigma_{ads}^R \quad (4)$$

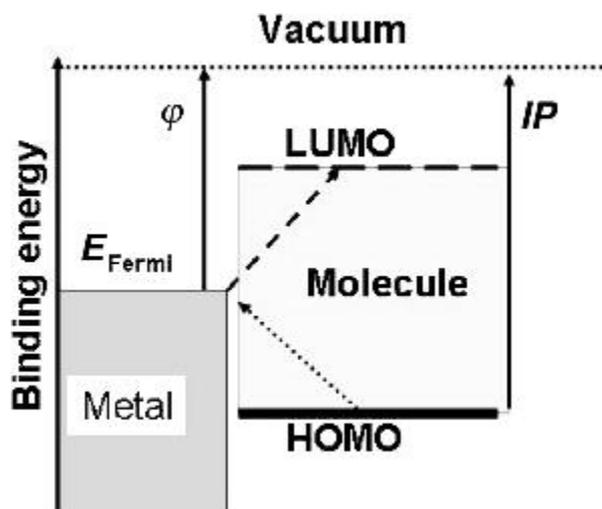
Este mecanismo é fundamental para o SERS, pois a ressonância do plasmon é necessária para observação do fenômeno, em outras palavras, na ausência da ressonância ou de superfícies metálicas com tal propriedade, o efeito não é observado (Aroca, 2006). Nesse modelo a intensificação ocorreria mesmo que o analito não estivesse ligado quimicamente à superfície, sendo necessário apenas que a molécula estivesse próxima à nanopartícula, além disso, o espectro obtido deveria ser semelhante ao espectro Raman da molécula. Os “*hot spots*”

estão diretamente associados a este modelo, pois nestas regiões estão ocorrendo o acoplamento de plasmons, ou ainda, a contribuição da intensificação do campo de duas partículas ou mais, gerando fatores de intensificação maiores ( $10^{12}$ ) (Le Ru e Etchegoin, 2009).

O modelo químico envolve modificações na polarizabilidade da molécula resultante da interação da molécula espalhadora com a superfície. Neste caso, a interação química entre a superfície e a molécula é essencial e os espectros podem apresentar um perfil completamente diferente daquele obtido para o espectro Raman normal da molécula em soluções aquosas. Mudanças observadas na comparação entre o espectro Raman normal e SERS podem estar associadas com a geometria de adsorção, provocando deslocamentos das bandas, mudanças nas intensidades relativas e intensificação de bandas atribuídas ao grupo que interage com a nanopartícula.

Os modelos de transferência de carga assumem que a adsorção de espécies moleculares em superfícies metálicas causa uma perturbação nos estados eletrônicos do adsorbato, alargando a distribuição energética dos níveis eletrônicos. Considerando a molécula adsorvida à superfície, tem-se que a energia do nível de Fermi encontra-se entre os estados ocupado de maior energia (HOMO) e o primeiro excitado desocupado de menor energia (LUMO). A transferência de carga ocorre entre o nível de Fermi e o LUMO, onde há a formação de uma retroligação  $\pi$  através dos orbitais envolvidos. Excitando-se o sistema com a linha laser em ressonância com a banda de transferência de carga, tem-se a intensificação do efeito químico (Figura 2).

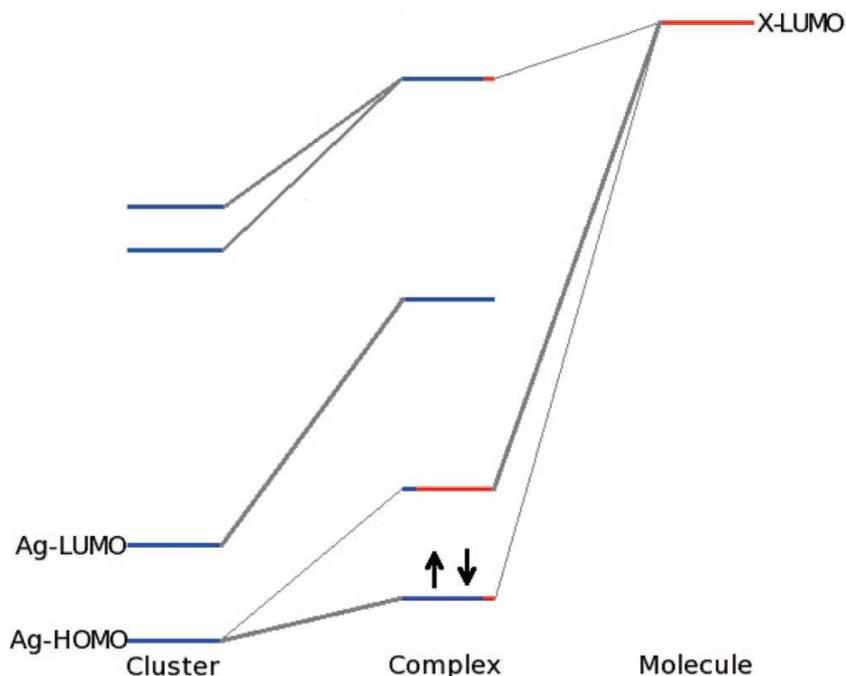
Figura 2 – Ilustração dos orbitais moleculares e da banda de valência da nanoestrutura.



Fonte: (Aroca, 2006)

Em 2009, Morton e Jensen publicaram um trabalho de simulação computacional para estudar a efeito químico no espectro da piridina e alguns derivados adsorvido em um nanopartícula de prata de 20 átomos. A partir da análise dos resultados, eles puderam perceber que a intensificação não aumenta com o aumento da carga transferida da molécula para a superfície. Na verdade o aumento na intensificação tem relação direta com a diferença energética entre o nível de Fermi do metal e o LUMO. Quanto maior a estabilização HOMO-LUMO, ou ainda, quanto maior a possibilidade de formação de retroligação  $\pi$ , maior intensificação pelo efeito químico (Figura 3). Um modelo foi elaborado a partir dos resultados obtidos, o qual foi verificado utilizando resultados experimentais de outras moléculas e enfim pôde-se perceber uma correlação significativa entre modelo e experimento.

Figura 3 –Diagrama para representação dos orbitais.



Legenda: Em vermelho a contribuição do orbital molecular para formação dos novos orbitais do complexo e em azul a contribuição da nanopartícula.

Fonte: (Morton e Jensen, 2009)

Foram relatados até aqui dois mecanismos que são utilizados para explicar o efeito SERS. O mecanismo eletromagnético e o mecanismo químico até então eram tratados de forma separadas, porém diversos fatores têm mostrado a necessidade de uma teoria mais completa que possa explicar os diversos aspectos do efeito Raman. Em um trabalho de 2012, Lombardi e Birke partem dos primeiros princípios para a obtenção de termos que envolvam os diferentes mecanismos de intensificação. Foi obtido uma expressão associando os termos relacionados ao plasmon e à transferência de carga, sem adição de qualquer termo apenas por experiência prática. As regras de seleção geradas são similares às propostas anteriores e preveem corretamente as intensidades relativas do espectro SERS de alguns casos em estudo.

#### 1.4. MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES METÁLICAS POR MERCAPTANAS

As monocamadas automontadas (SAM – *self-assembled monolayers*) podem ser definidas como filmes formados por moléculas orgânicas que se organizam espontaneamente sobre uma superfície (Benites *et al.*, 2014). A modificação de superfícies por SAM permite diversas aplicações como construção de sensores (ou biosensores) orgânicos e inorgânicos, proteção contra corrosão e o controle de propriedades físico-químicas e microeletrônica (Rubinstein *et al.*, 1988; Chaki *et al.*, 2001; Chaki e Vijayamohan, 2002; Eckermann *et al.*,

2010; Newton *et al.*, 2013). O início da proposta de modificação das superfícies remonta a década de 80 e até hoje diversos aspectos básicos permanecem obscuros, por outro lado, o desenvolvimento de novos materiais levou esta ideia até as estruturas nanométricas (Nuzzo, Zegarski e Dubois, 1987; Newton *et al.*, 2013). Na década de 90, os estudos conduzidos utilizavam, predominantemente, uma superfície estendida de ouro e um tiol (R-SH, onde R é um grupo alquila) para modificação da superfície e construção das SAM, contudo, na última década, o grafeno surgiu como outra superfície passível de ser modificada pelas SAM (Gronbeck, Curioni e Andreoni, 2000).

A formação de SAM de mercaptanas em nanopartícula de ouro permite a partícula adquirir boa estabilidade, evitando a agregação, obtenção de espectros SERS e controlar o caráter de hidrofobicidade ou de hidrofiliabilidade. Além disso, a modificação da superfície das nanopartículas pode ser usada para imobilização de diferentes moléculas em superfícies metálicas, como por exemplo a adsorção de  $\beta$ -caroteno em superfícies de prata modificadas por 2-mercaptoetanol (Wehling, Hill e Klockow, 1994; Kuznetsov *et al.*, 1996; Lee, Lee e Greenbaum, 1997; Tarabara, Nabiev e Feofanov, 1998; Smejkal *et al.*, 1999). A relação entre SAM e biomoléculas são inúmeras, dentre elas destaca-se a utilização para detecção de pesticidas, detecção de sequências do DNA com mutações gênicas ligadas ao câncer em níveis da ordem nanomolar (Raouf *et al.*, 2011).

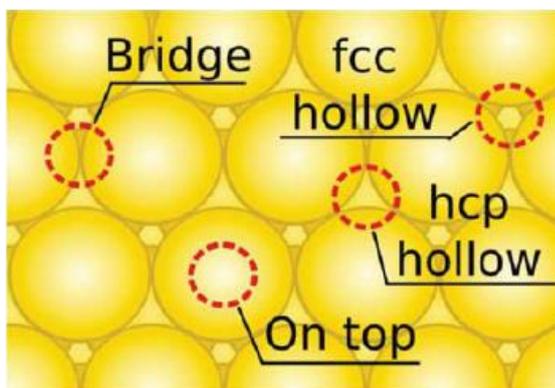
Em virtude do grande potencial desta proposta, muitos trabalhos utilizando mercaptanas em ouro foram realizados para investigar questões básicas relacionadas à adsorção como:

- 1 – Quimissorção ou fisissorção.
- 2 – Adsorção dissociativa e cisão da ligação S-H.
- 3 – Sítio de adsorção e orientação.
- 4 – Influência do comprimento da cadeia.

Apesar de todo o esforço da comunidade científica, há muito conflito na literatura envolvendo esses 4 pontos. Pode parecer óbvia a cisão da ligação S-H para haver a ligação com a superfície metálica, contudo há trabalhos que relatam a adsorção da mercaptana com a ligação S-H intacta (Newton *et al.*, 2013). Outro ponto de conflito está relacionado ao sítio de adsorção, entre os anos 2000 e 2005 diversos trabalhos de simulação computacional concluíram a adsorção via sítio buraco ou ponte em superfícies (111) de Au (Gronbeck, Curioni e Andreoni,

2000; Hayashi, Morikawa e Nozoye, 2001; Yourdshahyan, Zhang e Rappe, 2001; Morikawa *et al.*, 2002). No entanto, trabalhos mais recentes relatam o sítio em ponte como mais estável, além disso, algumas evidências experimentais apontam para a adsorção molecular via um único átomo da superfície (Kondoh *et al.*, 2003; Maksymovych *et al.*, 2005; Delrio *et al.*, 2011). Para entender melhor as diferenças entre os possíveis sítios de adsorção de uma superfície 111, visualizar a Figura 4.

Figura 4–Superfície (111) de ouro e os possíveis sítios de adsorção.

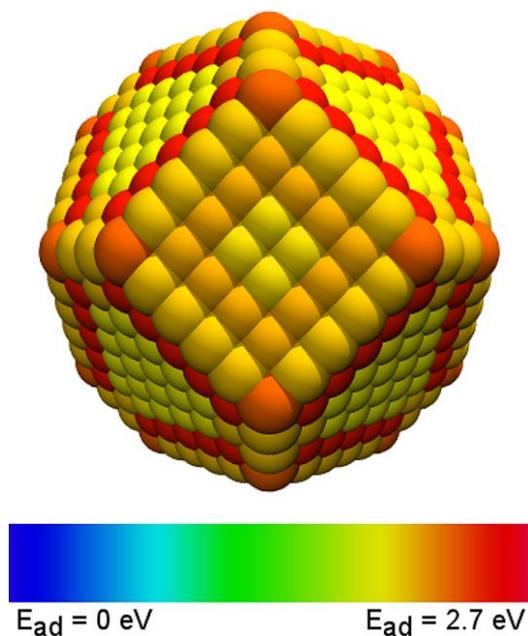


Fonte: (Fertitta, Voloshina e Paulus, 2014)

A maioria dos trabalhos teóricos envolve a adsorção do metanotiol ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) em superfície (111) de ouro, pois a DFT não descreve bem as interações de van der Waals.

Em um trabalho de 2013, Barnard modelou um nanocristal de ouro e investigou a adsorção de mercaptanas em diferentes sítios. A nanoestrutura criada por ela apresentava superfícies (100) e (111) e está ilustrada na Figura 5.

Figura 5–Mapa tridimensional da energia de adsorção do SCH<sub>3</sub>.



Legenda: Nanopartícula de ouro de 3,8 nm.

Fonte: (Barnard, 2013)

A figura 5 resume a conclusão do trabalho, que encontrou sítios mais favoráveis nas faces (111), posições adjacentes às arestas formadas com as faces (100), seguido pelos átomos que se encontram nos vértices. Sendo que neste trabalho foram considerados os sítios em ponte, exceto pelos vértices da nano estrutura (Barnard, 2013).

Em 2003, Kudelski publicou um artigo estudando diferentes mercaptanas, HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-X (X = NH<sub>2</sub>, OH, COOH, CH<sub>3</sub> e SO<sub>3</sub>Na), em eletrodo de ouro, prata e cobre através do efeito SERS (Kudelski, 2003b). Naquele estudo comparativo pôde-se observar a mudança nas intensidades relativas de bandas associadas aos confôrmeros das moléculas adsorvidas, sendo que, em ouro apresentou intensificação menor, por isso menor sensibilidade à mudanças na conformação molecular. A comparação entre os substratos metálicos levou à conclusão que a prata apresentou maior concentração da espécie trans, isto poderia significar seria um suporte melhor que ouro e cobre, pois o grupo terminal está mais acessível para interação com outras moléculas. Apesar da estrutura química simples, as moléculas se mostraram bastante sensíveis a densidade de moléculas adsorvidas, ao substrato e ao ambiente químico. Em um outro trabalho, Kudelski discute especificamente a adsorção do 2-mercaptoetanol em eletrodo de prata, cobre e ouro (Kudelski, 2003a). Ele faz a atribuição dos espectros e diversas considerações a fim de explicar as diferenças observadas entre o espectro Raman do MET líquido e do SERS. Ele verificou que a mudança de concentração do MET leva a uma mudança

na intensidade relativa entre as bandas das espécies *gauche* e *trans*. Tal variação foi atribuída a conformação *gauche* ocupar “mais espaço” da superfície que a molécula na conformação *trans*. Em 2012, Pathem *et al.* publicaram um artigo discutindo a adsorção de uma mercaptana sensível a radiação ultravioleta, fazendo-a mudar a conformação. Tal estudo empregou tanto SERS, como simulação computacional que permitiram monitorar a cinética de fotoisomerização das moléculas.

Diante das informações apresentadas pelos diferentes trabalhos, pode-se perceber o potencial da proposta de modificação de superfícies metálicas por mercaptanas, bem como notar a necessidade de se contribuir com conhecimentos mais básicos para entender a adsorção e a formação de monocamadas em nanopartículas.

### 1.5. SERS DO TRP E DE PEPTÍDEOS

Os aminoácidos são as unidades básicas para construção de proteínas e enzimas, por isso, torna-se fundamental o conhecimento das interações individuais dos aminoácidos com nanopartículas, a fim de ajudar a entender o efeito SERS em estruturas biológicas mais complicadas. Diversos estudos SERS foram conduzidos na literatura sobre o triptofano (L-Trp), fenilalanina, tirosina, alanina, lisina entre outros (Suh e Moskovits, 1986; Kim, Kim e Suh, 1987; Stewart e Fredericks, 1999; Podstawka, Ozaki e Proniewicz, 2004; 2005; Aliaga *et al.*, 2009). O L-Trp é uma das principais moléculas que contém o indol presentes na natureza, tal abundância faz com que seja precursor de muitos compostos com importância para os sistemas biológicos como serotonina, niacina e auxina (Fernstrom, 1983; Schaechter e Wurtman, 1990; Radwanski e Last, 1995; Gollnick *et al.*, 2005).

Na região do UV, diversas proteínas apresentam bandas de absorção e emissão que são, geralmente, atribuídas ao L-Trp, tirosina e fenilalanina. O L-Trp apresenta absorção em 280 nm e fluorescência em 350 nm, por conta destas características, diversos trabalhos empregando a técnica Raman, com excitação na região do UV, têm sido realizados desde a década de 80 (Rizzo *et al.*, 1985; Rizzo *et al.*, 1986; Sipior *et al.*, 1987; Sipior e Sulkes, 1988). A partir destes diversos estudos, foi possível estabelecer relações diretas entre bandas do espectro Raman com conformação ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ), caráter de hidrofobicidade ( $1360/1340\text{ cm}^{-1}$ ) e ligação de hidrogênio ( $878$  e  $1490\text{ cm}^{-1}$ ) (Takeuchi, 2003). Em 2010, um estudo teórico e experimental sobre o triptofano em meio aquoso foi publicado por Hernandez *et al.* Ao contrário

de outros trabalhos, que simulavam o espectro da molécula em estado gasoso, a investigação na presença de moléculas de água para melhor aproximação com o espectro experimental.

Os primeiros trabalhos estudando a adsorção do L-Trp em prata por SERS foram realizados no fim da década de 80 por Kim *et al.*, contudo, menos de dez bandas foram analisadas e estudadas (Kim, Kim e Suh, 1987; Lee, Suh e Kim, 1988). Eles mostraram significativa intensificação das bandas atribuídas ao estiramento simétrico do  $\text{COO}^-$  e estiramento C-COO, concluindo que a adsorção da molécula ocorre tanto pelo grupo carboxilato quanto pela amina. O estudo SERS da glicina e da alanina em coloides de prata foi realizado por Suh e Moskovits (1986). Após algumas mudanças de pH, os resultados obtidos indicaram que os aminoácidos possuem o  $\text{NH}_2$  e o carboxilato adsorvendo à superfície de prata. Herne *et al.* (1991) estudaram dipeptídeos e também atribuem a adsorção à superfície de prata ao  $\text{NH}_2$  ao invés do  $\text{NH}_3^+$ . Chuang e Chen (2009). apresentaram um trabalho mais completo para atribuição do espectro SERS do L-Trp em prata, contudo, eles obtiveram conclusões semelhantes aos trabalhos anteriores quanto ao sítio de adsorção da molécula.

Os primeiros trabalhos com nanopartículas foram realizados em prata, em ouro os estudos são mais recentes, por exemplo, o trabalho de Tu *et al.* (2010) que estuda o L-Trp e outras moléculas que possuam o anel indol através do efeito SERS. Naquele estudo observa-se o deslocamento de diversas bandas associadas ao anel indólico para menor energia, a justificativa proposta envolve a formação de ligação de hidrogênio entre a superfície e a molécula. Em 2015, Hussain e Pang observaram a mudança do perfil espectral do Trp em nanopartículas de ouro de acordo com o método de síntese utilizado como substrato. Naquele trabalho foram sintetizados dois coloides, em um deles o sal de ouro foi reduzido por citrato, enquanto o outro por boroidreto de sódio. Foi observado por eles, que o L-Trp adsorve em coloide reduzido por citrato através da amina protonada, mantendo o anel perpendicular à superfície. Há de se destacar o mesmo comportamento observado no trabalho de Tu *et al.* (2010), onde as bandas do anel se mostram mais deslocadas para menor energia quando comparadas ao SERS em prata e ao Raman. Por outro lado, em nanopartículas sintetizadas na presença de boroidreto, a adsorção do aminoácido ocorre principalmente via os elétrons  $\pi$  do anel indol. Em outro trabalho, López-Tobar *et al.* (2015) estudaram os sítios de adsorção da Somatostatina (peptídeo formado por 14 aminoácidos) em nanopartículas metálicas através da espectroscopia SERS. Em prata, eles concluem que a adsorção se dá através de par iônico entre o cloreto, presente na superfície da nanopartícula de prata, e o grupo  $\text{NH}_3^+$  da lisina. Em ouro, há a intensificação de bandas associadas ao L-Trp e o surgimento de uma banda em  $253 \text{ cm}^{-1}$

que pode ser atribuída à formação de uma ligação Au-N. Aquele foi o primeiro trabalho a propor a adsorção do L-Trp em ouro através da coordenação pelo nitrogênio do indol.

Em virtude das potencialidades da associação entre nanopartículas e biomoléculas e da carência de informações básicas sobre estrutura e afinidade com superfícies metálicas, este trabalho tem por objetivo estudar aminoácidos e peptídeos que contenham L-Trp para estabelecer padrões que possam ser utilizados em sistemas mais complexos.

## 2. OBJETIVOS

O trabalho tem por objetivo o estudo das adsorções de triptofano e oligopeptídeos derivados de triptofano através de técnicas espectroscópicas SERS e LSPR, bem como investigar a modificação de nanopartículas de prata com 2-mercaptoetanol através de experimentos SERS, LSPR e por cálculos *ab initio*.

Os objetivos específicos são:

Síntese e otimização de nanoprismas triangulares de prata com tamanho controlado para obtenção de ressonância na região espectral do vermelho-infravermelho próximo;

Preparação e otimização de filmes finos de prata sobre substratos de vidro e de silício para utilização como substrato SERS na região do infravermelho próximo.

Estudo por espectroscopia SERS da interação entre o Trp e oligopeptídeos derivados de Trp em nanopartículas de prata ou ouro para determinar sítio de adsorção bem como a influência dos diferentes ambientes químicos no espectro do Trp.

Estudo teórico da interação entre a superfície 111 de prata e o 2-mercaptoetanol para determinação do sítio de adsorção e conformação preferencial.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. EQUIPAMENTOS

Espectrômetro SENTERRA Bruker com radiação excitante em 532, 632,8 e 785 nm.

Espectrômetro FT-Raman Bruker RFS 100 equipado com laser Nd:YAG com radiação excitante em 1064 nm.

Espectrofotômetro Shimadzu modelo UVPC 1800 na faixa de 190 a 1100 nm

Microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (FEI), modelo Magellan 400L. (INMETRO/RJ)

#### 3.2. REAGENTES:

Nitrato de prata ( $\geq 95\%$ ; Sigma-Aldrich), ácido tetracloroáurico ( $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich), sulfato de cobre ( $\geq 99\%$ ), Polivinilpirrolidona (PVP) (PM=40000;  $\geq 99,5\%$ ; Sigma-Aldrich), citrato de sódio ( $\geq 99\%$ ), boroidreto de sódio ( $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich), peróxido de hidrogênio ( $\geq 30\%$  Vetec), 2-mercaptoetanol (MET) ( $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich), L-triptofano (L-Trp) ( $\geq 98\%$ ; Sigma-Aldrich), alanina-triptofano (Ala-Trp) ( $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich), triptofano-glicina (Trp-Gly; Sigma-Aldrich), pirroglutamina-lisina-triptofano-alanina-prolina (P5) (95%; Sigma-Aldrich), triptofano-histidina-triptofano-leucina-glutamina-leucina (P6) (Sigma-Aldrich), 4-mercaptopiridina (MPy) ( $\geq 95\%$ ; Sigma-Aldrich), 3-(aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) ( $\geq 97\%$ ; Sigma-Aldrich), ácido clorídrico, ácido nítrico e água deionizada.

#### 3.3. LIMPEZA DAS VIDRARIAS

Primeiramente, todas as vidrarias foram limpas com água régia (mistura de HCl e HNO<sub>3</sub>, na proporção 3:1), a seguir elas foram lavadas com água deionizada diversas vezes, a fim de remover o excesso de água régia. Por último, as vidrarias volumétricas foram deixadas para secar à temperatura ambiente, enquanto que as demais foram expostas ao aquecimento. Este processo foi realizado para todas as sínteses e sempre no dia anterior ao experimento.

### 3.4. SÍNTESE DE NANOPRISMAS DE PRATA 1, 2 e 3 (AgNP1, 2 E 3)

As sínteses foram baseadas no trabalho de Tsuji *et al.* (2012). O coloide AgNP1 foi preparado pela mistura de soluções aquosas de AgNO<sub>3</sub> (0,1 mM, 50 mL), citrato de sódio (30 mM, 3 mL), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% m/v, 120 µL) e NaBH<sub>4</sub> (100 mM, 280 µL). Inicialmente, foram adicionados ao erlenmeyer a solução de nitrato de prata, citrato e peróxido de sódio. Um agitador e uma barra magnética foram utilizados para garantir a homogeneidade do sistema. Por último, a solução de boroidreto (100 mM, 280 µL) foi adicionada ao erlenmeyer e então a reação foi iniciada. Inicialmente, observou-se que o coloide era amarelo, com o avanço da reação, passou para um amarelo pálido e enfim ocorreu uma evolução gradativa da coloração, passando pelo laranja, vermelho e terminando em azul. A reação permaneceu sob agitação até 30 minutos depois da adição do NaBH<sub>4</sub>. As concentrações finais dos reagentes AgNO<sub>3</sub>, citrato de sódio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaBH<sub>4</sub> foram respectivamente 0,094; 1,70; 2 e 0,528 mM.

O coloide AgNP2 foi sintetizado de forma semelhante ao AgNP1, porém adicionando-se 3 mL de uma solução 30mM de PVP, antes da adição de boroidreto de sódio à mistura.

O coloide AgNP3 foi preparado de maneira semelhante ao AgNP1. A única mudança consiste na realização da síntese sob banho de gelo (~4°C).

Tanto no coloide AgNP2 quanto no coloide AgNP3, inicialmente há o surgimento de uma coloração amarela que modifica-se com o avanço da reação e por fim atinge um tom de vermelho.

### 3.5. SÍNTESE DE AgNP's SOB TEMPERATURA CONTROLADA (AgNP 4, 5, 6 e 7)

Os coloides AgNP 4, 5, 6 e 7 possuem um procedimento sintético semelhante ao AgNP1. Todas as quatro sínteses podem ser divididas em duas etapas, na primeira são formadas as nanopartículas esféricas de prata, enquanto na última ocorre a reação com o peróxido e formação dos prismas.

A primeira etapa consiste na mistura de soluções aquosas de AgNO<sub>3</sub> (50mL, 0,1 mM) e citrato de sódio (3 mL, 30 mM). O NaBH<sub>4</sub> (280 µL, 100 mM) foi adicionado sob agitação magnética, formando um coloide precursor aos prismas, o qual possui cor amarela.

Na segunda etapa, retirou-se o erlenmeyer da agitação e foi transferido para um banho ultratermostático, o qual já se encontrava com a temperatura ajustada em 5, 10, 27 e 40 °C para os respectivos coloides 4, 5, 6 e 7. O coloide foi deixado no banho por 30 minutos para

a promoção do equilíbrio térmico. Depois deste período, uma solução aquosa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (120  $\mu\text{L}$ , 30% m/v) foi adicionada. Somente após outros 30 minutos, os erlenmeyers foram removidos do banho e os coloides armazenados em recipientes de vidro com tampa em ambiente refrigerado. Ao fim da reação, verificou-se que as suspensões coloidais apresentaram diferentes cores entre si.

### 3.6. CRESCIMENTO CONTROLADO DOS NANOPRISMAS ( $\text{AgNP}_8$ )

Esta síntese foi realizada em três etapas. As duas primeiras são equivalentes a  $\text{AgNP}_6$  (Descrição no item anterior), ou seja sintetizou-se um novo coloide à temperatura de  $27^\circ\text{C}$ . A suspensão foi deixada por 24 horas em ambiente refrigerado para eliminar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual, e então foi realizada a etapa a seguir.

Misturou-se 50 mL do coloide equivalente ao  $\text{AgNP}_6$  com 25 mL de uma suspensão coloidal contendo pequenas esferas de prata (coloide amarelo sintetizado na primeira etapa do procedimento anterior). Transferiu-se o erlenmeyer para o banho ultra termostático, deixando-o por 30 minutos a  $27^\circ\text{C}$  para promover o equilíbrio térmico. Por último, foi adicionado o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (120  $\mu\text{L}$ , 30% m/v). Deixou-se a síntese ocorrer por 30 minutos, então removeu-se do banho e armazenou-se em um frasco de vidro sob ambiente refrigerado.

### 3.7. SÍNTESE DO COLOIDE $\text{AgNPC}$ (NANOESFERAS)

Esta síntese foi baseada no trabalho de Creighton *et al.* (1979). Preparou-se uma solução aquosa de  $\text{NaBH}_4$  (30 mL, 2 mM) e adicionou-se, gota a gota, uma solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (10 mL, 1 mM) sob agitação magnética. Após a adição, a suspensão coloidal foi deixada sob agitação por mais 30 minutos, a fim de garantir o término da reação. Posteriormente, as nanopartículas foram transferidas para um recipiente de vidro com tampa e armazenadas na geladeira.

### 3.8. SÍNTESE DE NANOPRISMAS DE PRATA DOPADOS COM COBRE. ( $\text{AgCuNP}$ )

As soluções aquosas de  $\text{AgNO}_3$  (0,1 mM, 50 mL), citrato de sódio (30 mM, 3 mL),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% m/v, 120  $\mu\text{L}$ ) e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,63mM, 200  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas a um erlenmeyer e homogeneizadas com o auxílio de um agitador. Por último, o  $\text{NaBH}_4$  (100 mM, 280  $\mu\text{L}$ ) foi

adicionado à solução e então a reação foi iniciada. O coloide adquiriu cor azul ao fim de 30 minutos após a inserção do boroidreto no meio reacional. A síntese foi realizada sob agitação magnética e ao fim foi transferida para um frasco com tampa. (Tsuji *et al.*, 2013)

### 3.9. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNP)

Preparou-se o volume de 62,5 mL da solução de  $\text{HAuCl}_4$  ( $5.10^{-4}\text{M}$ ), o qual foi transferido para um erlenmeyer. O erlenmeyer foi levado a um banho, o qual foi aquecido até que o termômetro indicasse  $80\text{ }^\circ\text{C}$  e foi mantido nesta temperatura durante toda a reação. A partir do momento que a temperatura foi estabilizada, adicionou-se 7 mL da solução de citrato de sódio (1% m/v). A mistura reacional permaneceu sob aquecimento por 1 hora após observada a mudança da coloração de incolor para vermelho, a qual é característica da formação de nanopartículas esféricas de ouro. (Frens, 1973)

### 3.10. CONSTRUÇÃO DOS FILMES FINOS DE PRATA

Os filmes finos foram elaborados seguindo os procedimentos de Brito-Silva (2011). Como substrato de vidro foram utilizadas lamínulas de vidro cortadas. Após a limpeza realizada com água régia, estes substratos foram imersos em uma solução formada por APTMS e tolueno 30% em volume. Após 12 horas, as lâminas foram lavadas com etanol 99,99% e colocadas para secar em uma estufa a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Por último, a lâmina permaneceu imersa no coloide AgNP1 por 24 horas. Antes de armazenar, as lâminas foram lavadas com água deionizada.

### 3.11. ESPECTROS UV-VIS DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS E FILMES FINOS.

Este experimento foi realizado para todas as AgNPs a fim de se saber onde se encontrava a ressonância da banda LSPR e avaliar a dispersão de tamanhos. Os espectros foram obtidos em um Espectrômetro UV-VIS da Shimadzu mod.: UV-1800 com o auxílio de uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 5 mm, na qual foi adicionada uma alíquota de 2mL das AgNPs.

No caso dos filmes finos, colocou-se uma lâmina de vidro em uma cubeta de quartzo e obteve-se o espectro da lâmina sem modificação. O espectro da lâmina modificada foi obtido da mesma forma.

### 3.12. ESPECTROS UV-VIS DE AgNP8 EM PRESENÇA DE MET.

Os espectros foram obtidos misturando-se uma alíquota de 1 mL do coloide com 1 mL da solução de MET. As soluções originais de MET possuíam concentrações de  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  e  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  para obter a concentração final de  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  e  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ , respectivamente. O espectro nomeado apenas por AgNP8 foi obtido misturando-se 1 mL de coloide a 1 mL de água deionizada.

### 3.13. ESTUDO CINÉTICO DE ADSORÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES QUÍMICAS NA SUPERFÍCIE DAS AgNPs.

O procedimento, a seguir, foi adotado para estudo da cinética de adsorção do KCl e do D-Trp em nanoprismas de prata. Primeiro, misturou-se uma alíquota de 1 mL do coloide com 1 mL da solução do composto de interesse, e então os espectros foram obtidos em intervalos de tempos regulares.

### 3.14. MICROSCOPIA DAS NANOPARTÍCULAS (AgNP1, AgNPC, AgCuNP)

Em todos os casos, as medidas de microscopia foram realizadas em parceria com o Inmetro. Para obtenção destas imagens foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura FEG-SEM de alta resolução da marca FEI. O procedimento de preparação da amostra consiste em centrifugar o coloide; remover o sobrenadante; adição de água até completar o volume original; ressuspensão das nanopartículas com auxílio de um banho ultrassônico. Este ciclo de centrifugação e redispersão foi realizado 3 vezes. Após este processo, foi realizada a diluição do coloide, até que a cor do mesmo se tornasse pouco intensa, quase incolor. Com uma micropipeta, coletou-se 100  $\mu\text{L}$  do coloide diluído. Descartou-se a primeira gota e a segunda foi colocada sob um substrato de silício, o qual foi levado à estufa a vácuo para remoção do excesso de água.

### 3.15. ESPECTROS SERS DE DIFERENTES ADSORBATOS EM SUSPENSÕES COLOIDAIIS E EM FILMES FINOS.

Todos os experimentos SERS foram realizados baseando-se no trabalho de Darby e Le Ru (2014). Isto é, resumidamente, todos os adsorbatos foram adicionados em igual proporção ao volume de coloide. Misturou-se 200  $\mu\text{L}$  do coloide e 200  $\mu\text{L}$  da solução do adsorbato em um microtubo e então o espectro foi obtido. Todas as concentrações indicadas nos resultados se referem às concentrações finais.

A obtenção de espectros SERS na presença dos nanoprismas de prata só foi possível após a remoção do excesso dos estabilizantes como descrito a seguir. Primeiramente, foi realizado a centrifugação do coloide a 8000 rpm durante 30 minutos, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o coloide para o mesmo volume original, auxiliado por um banho ultrassônico. Este processo foi repetido mais duas vezes, e só então misturado ao adsorbato em estudo. Utilizou-se o FT-Raman (linha laser 1064 nm e potência de 100 mw) para obtenção de espectros SERS com os nanoprismas.

O coloide AgNPC permitiu a utilização da linha laser 532 nm como 633 nm do SENTERRA para obtenção de espectros SERS. Por outro lado, os espectros na presença de nanopartículas de ouro foram obtidos somente com a linha de excitação em 633 nm do SENTERRA. As potências variaram conforme a situação, mas se encontram entre 2 e 5 mw.

Para os filmes finos, foi realizada a imersão do filme fino de prata em uma solução de 4-MPy  $10^{-4}$  M por 30 minutos. A seguir, lavou-se o filme fino com água deionizada, que foi levado para secagem em uma estufa a vácuo. Neste caso foi utilizada a radiação de 785 nm.

### 3.16. METODOLOGIA COMPUTACIONAL

Nesta dissertação utilizou-se o pacote Quantum Espresso, que é caracterizado por ser um software livre, possuindo diversas ferramentas úteis, dentre as quais destacam-se o cálculo de energia total, densidade de carga, estrutura eletrônica de sólidos e moléculas com condições de contorno periódicas (Giannozzi *et al.*, 2009). No estudo da adsorção do 2-mercaptoetanol foi utilizado o funcional PW91 para descrição do efeito de troca e correlação.

O estudo da adsorção do 2-mercaptoetanol envolveu a construção de uma superfície (111) com 3 camadas atômicas a fim de simular o efeito do bulk. Uma supercélula 3x3 foi gerada para garantir que as interações entre moléculas vizinhas sejam desprezíveis. A partir de

testes de convergência de energia, verificou-se a necessidade de utilizar uma energia cinética de 80 Ry e amostragem de 6x6x1 tanto em ouro quanto em prata.

As Figuras representando a adsorção da molécula nas diferentes superfícies metálicas foram obtidas através da utilização do pacote gráfico XCRYSDEN (Kokalj e Causà, 2003).

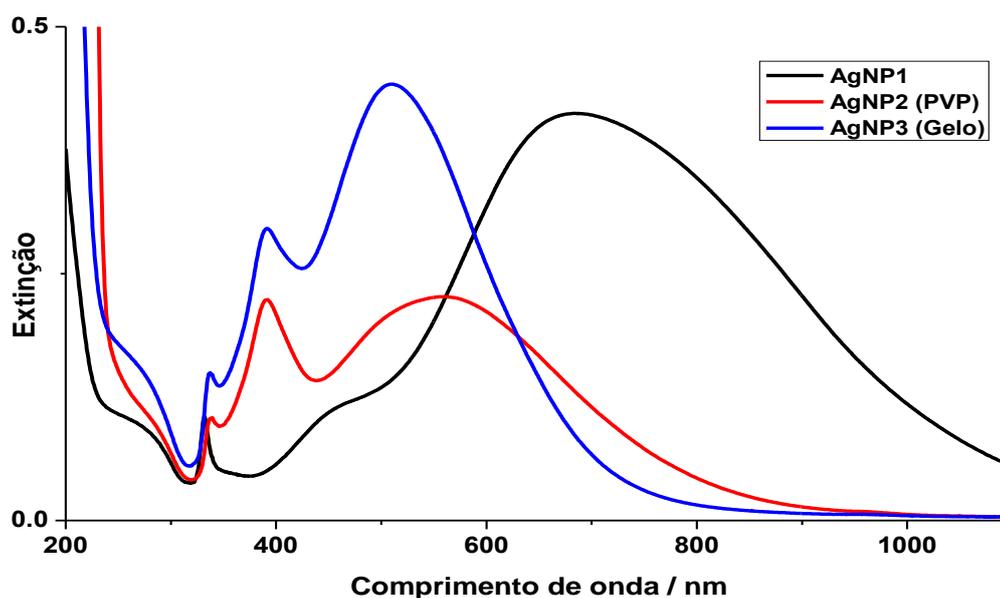
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão discutidas as sínteses das AgNPs sob diferentes parâmetros, formação do filme fino, adsorção do MET e a obtenção dos espectros SERS de moléculas de prova, assim como do Trp e oligopeptídeos.

##### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS AgNPs

Na Figura 6 são apresentados os espectros UV-VIS de 3 coloides diferentes, AgNP1, AgNP2 (AgNP1+PVP) e AgNP3 (AgNP1 realizada em banho de gelo). Os dois primeiros foram preparados em temperatura ambiente. A presença do PVP na síntese se dá a fim de obter menor dispersão de tamanhos e formação preferencial de AgNPs triangulares. Porém, do ponto de vista de SERS, este reagente pode trazer problemas posteriormente, pois pode provocar algum tipo de impedimento estérico para a obtenção dos espectros dos oligopeptídeos de interesse.

Figura 6 – Espectros UV-VIS dos coloides AgNP1, AgNP2(PVP) e AgNP3(Gelo).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Primeiramente, vale definir alguns conceitos para facilitar o entendimento. As expressões no “plano” e “fora do plano” foram utilizadas em conforme ao proposto anteriormente por Kelly *et al.* em 2003. O espectro UV-VIS do coloide AgNP1 possui a banda de maior intensidade com máximo em 687 nm. Esta banda refere-se à transição LSPR (*Localized Surface Plasmon Resonance*) do prisma no plano (Kelly *et al.*, 2003). Enquanto que a banda em 332 nm é atribuída ao quadrupolo fora do plano (espessura). O ombro em 460 nm

pode ser atribuído como uma composição de duas bandas que se encontram próximas, o quadrupolo no plano e o dipolo fora do plano. A coloração azul apresentada por este coloide é justificada pelo máximo da absorção na região do vermelho. Observa-se ainda que as bandas em 460 e 687 nm apresentam uma largura significativa, permitindo concluir que há grande dispersão de tamanhos. Além disso a presença destas 3 bandas é uma característica típica de nanoprismas.

O segundo coloide, AgNP2, apresenta atribuição semelhante ao anterior, onde, a banda em 560 nm é atribuída ao dipolo no plano e a banda em 338 nm é referente ao quadrupolo fora do plano. A diferença nos espectros ocorre pela presença de uma banda em 392 nm que, provavelmente, é atribuída às partículas nucleadoras de prata. Novamente, observando o formato da banda pode-se inferir que este coloide não possui distribuição estreita de tamanho. Por último, o AgNP3 possui os mesmos reagentes do primeiro, porém a síntese foi realizada sob banho de gelo (em torno de 4°C). Por outro lado, as AgNPs apresentaram o menor tamanho médio (máximo da transição LSPR deslocado para o azul) dentre as 3 sínteses, que não se mostrou otimizada para a obtenção de espectros na região do vermelho e infravermelho próximo, como o proposto originalmente. A banda em 391 nm é atribuída às pequenas esferas de prata, enquanto que a banda em 337 nm é referente à transição LSPR do quadrupolo da espessura dos nanoprismas formados.

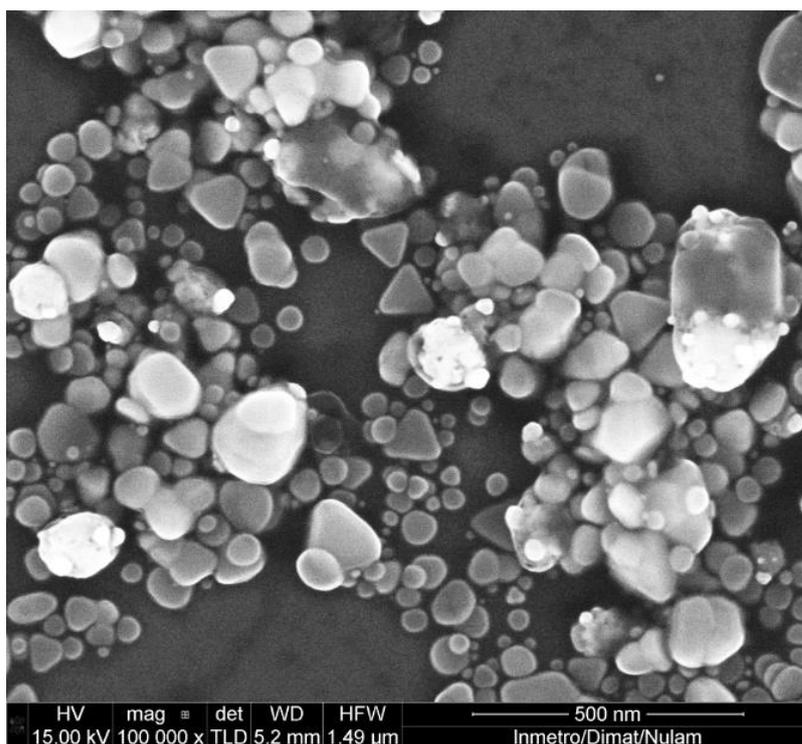
A síntese em banho de gelo apresentou a largura da banda LSPR mais estreita do que os demais, sugerindo menor distribuição de tamanho. Contudo, do ponto de vista de substrato SERS, esta síntese apresenta ressonância com radiações no verde, enquanto que o maior interesse se dá na região do infravermelho próximo. Além disso, observa-se que a banda relativa às partículas nucleadoras de prata apresentam uma intensidade muito maior na segunda e na terceira síntese. Ou seja, o rendimento de ambas as sínteses na formação de prismas é menor do que a primeira. Por último, o PVP não se mostra um agente tão importante para redução da distribuição de tamanhos, sendo o controle de temperatura muito mais relevante, por isso não se mostra uma síntese interessante, uma vez que ele compete com os adsorbatos de interesse pela superfície da AgNP.

Na micrografia (figura 7) obtida do coloide AgNP1, pode-se observar a formação de prismas triangulares. Por outro lado, é possível visualizar a presença de outras formas de prismas na imagem. A presença de AgNPs hexagonais seria até esperado devido à rota sintética utilizada, contudo a grande maioria das AgNPs obtidas não são de nenhuma forma e nem outra,

mas uma terceira, a qual pode ser denominada nanodiscos. Sendo assim, pode-se dizer que a síntese não se mostrou eficiente para alto rendimento na formação de prismas triangulares.

Além de formatos bem distintos, a imagem apresenta partículas de tamanhos bem diferentes, os quais variam de 20 a 100 nm. Fato este, que pode ser relacionado diretamente com a banda larga obtida no espectro UV-VIS deste coloide, caso contrário a banda seria mais estreita. De forma resumida, a imagem mostra que a sobreposição de prismas gera imagens com diferentes contrastes, por se tratar de uma técnica de microscopia de varredura, este fenômeno só é possível de ser observado por causa de AgNPs com espessura pequena. Esta característica pode ser correlacionada diretamente com o experimento de UV-VIS. Quanto maior a razão de aspecto, mais deslocada para o infravermelho a banda LSPR do dipolo no plano irá se apresentar. Tal hipótese poderia ser corroborada pela realização de microscopias, as quais não foram obtidas por motivo de prioridade e disponibilidade.

Figura 7 –Micrografia do coloide AgNP1.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Sempre que se discute síntese de nanopartículas, questiona-se a reprodutibilidade de um método. O estudo espectroscópico a seguir, discute a influência da temperatura na realização da síntese de AgNPs triangulares sob diferentes temperaturas.

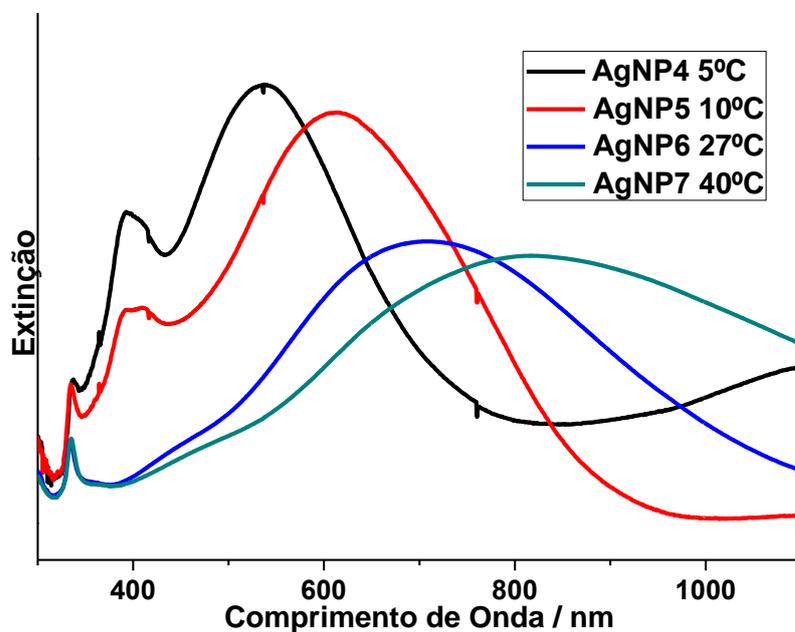
Primeiramente há de se observar que todos os experimentos foram realizados sob banho ultratermostático com controle de temperatura capaz de resfriar ou aquecer, com variação

de apenas 0,1 °C. Contudo não foi possível haver agitação durante o processo de formação dos prismas.

Foram realizadas 4 sínteses em temperaturas de 5, 10, 27 e 40°C, as quais apresentaram máximo da banda LSPR (Figura 8) em diferentes comprimentos de onda, bem como diferentes distribuições de tamanho. Contudo, apesar das alterações, foi possível observar as bandas características de prismas.

Nos espectros dos 4 coloides observa-se a presença da banda em ca. 335 nm referente à transição LSPR do quadrupolo fora do plano, característico da presença de prismas. As sínteses realizadas em 5 e 10°C apresentam uma banda na região de 400 nm que é característica de nanopartículas nucleadoras de prata. Possivelmente, nestas condições as nanopartículas precursoras não são totalmente consumidas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e por isso apresentam esta banda. Nos espectros dos outros dois coloides, é possível observar a presença de um ombro em torno de 500 nm que é atribuído a uma combinação entre o quadrupolo fora no plano e o dipolo fora do plano. Por último, a atribuição das bandas de maior intensidade de cada espectro em 537,5 nm, 614 nm, 709 nm e 818 nm é referente ao dipolo no plano dos prismas.

Figura 8—Espectros UV-VIS dos coloides AgNP4, 5, 6 e 7.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

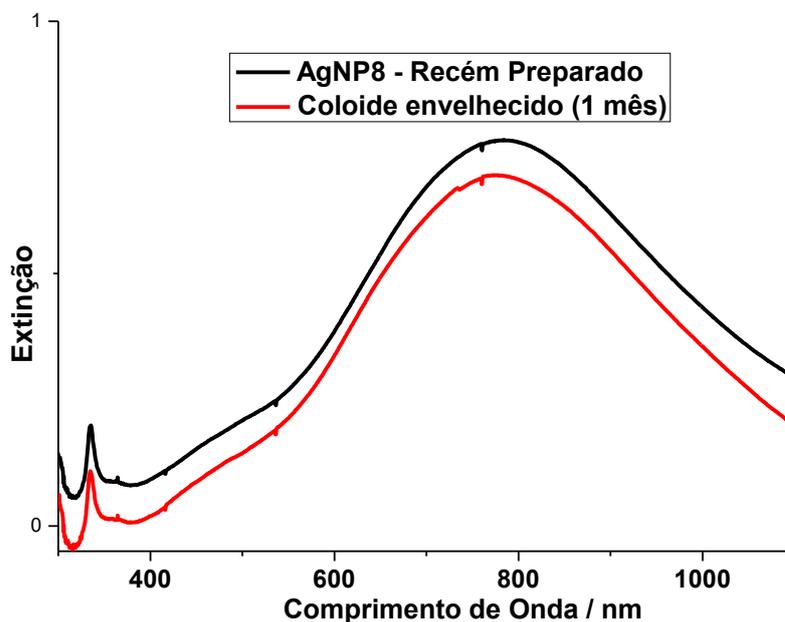
Este conjunto de dados torna clara a importância da temperatura para a síntese de AgNPs triangulares de prata. O aumento da temperatura favorece a formação de partículas maiores, ou ainda, coloides que possuem a banda LSPR deslocada para maiores comprimentos

de onda. Além de favorecer a formação de partículas maiores, observa-se um alargamento da banda associada à elevação da temperatura. Visualmente, observou-se que a coloração observada ao fim de 30 minutos de síntese foi obtida mais rapidamente pelo coloide em 40°C. Comparando o espectro UV-VIS do coloide sintetizado à 27°C com o AgNP1, observa-se uma diferença na distribuição de tamanho, apesar de possuírem o máximo em posições semelhantes. A largura de banda do coloide sem controle de temperatura é mais estreita enquanto que esta apresenta-se mais larga. Uma possível causa de tal comportamento é a presença da barra magnética no procedimento experimental da AgNP1 enquanto que a outra não possui agitação. Como o objetivo deste trabalho envolve a obtenção de espectros SERS com excitação no vermelho ou no infravermelho próximo, os coloides em temperatura igual ou maior a 27°C mostram-se mais promissores.

Torna-se claro que o controle de temperatura é fundamental para a reprodutibilidade de uma síntese, pois a temperatura ambiente do laboratório não é controlada, ou seja, em diferentes épocas do ano pode-se atingir 15°C e em outras 30°C. Realizando-se a mesma síntese, utilizando os mesmos reagentes, equipamentos e procedimentos em dias diferentes não seria possível a obtenção de coloides com características semelhantes entre si. Assim sendo, a temperatura constitui um fator preponderante na síntese de nanopartículas metálicas.

Outro método utilizado para obtenção de partículas com ressonância na região do infravermelho próximo foi a adição de um coloide precursor à síntese realizada à temperatura de 27°C (AgNP6) e assim sendo obteve-se um coloide com partículas maiores que as anteriores (AgNP8), característica evidente nos espectros da Figura 4.

Figura 9 – Espectros UV-VIS do coloide AgNP8 recém preparado e após um mês armazenado.



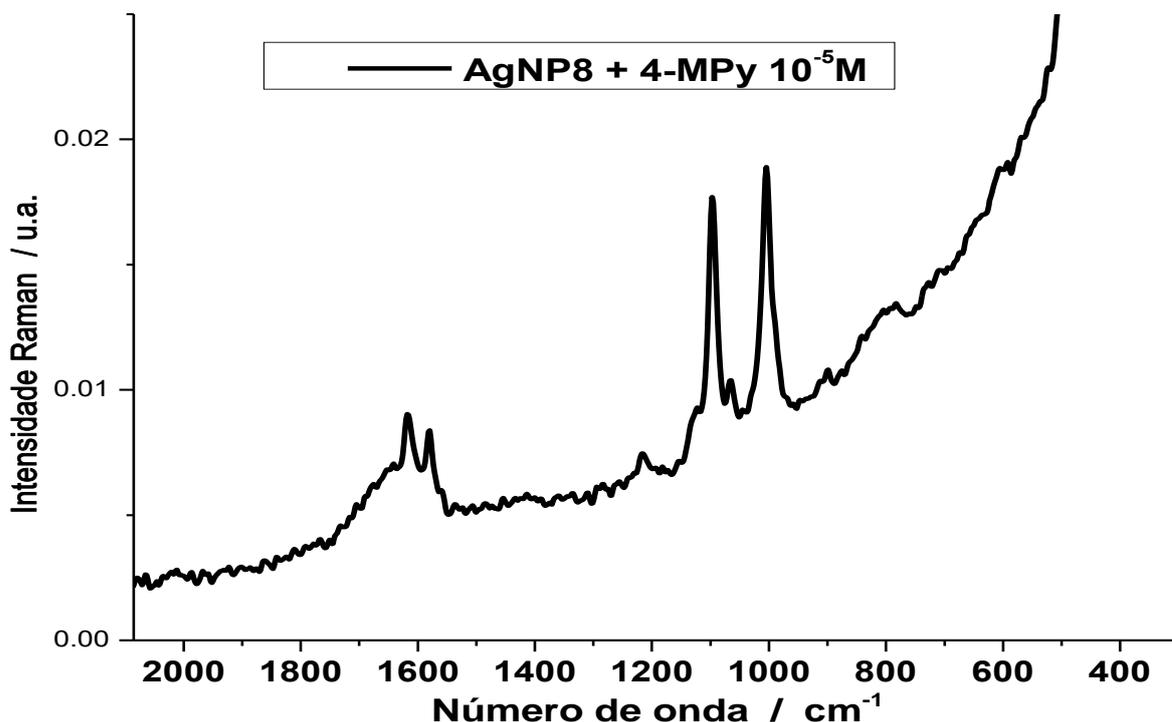
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Originalmente, o espectro da AgNP6 possuía um máximo em torno de 700 nm (Figura 4), após a adição de partículas nucleadoras de prata é possível observar um deslocamento da banda para cerca de 780 nm. Outra evidência do sucesso do crescimento dos prismas está no ombro que estava em torno de 460 nm e agora se desloca para 500nm. Deve-se observar ainda que a síntese realizada à 40°C (AgNP7) apresenta máximo em torno de 820 nm, porém a distribuição de tamanho, evidenciada pela largura da banda, é menor no coloide AgNP8. Por último, a análise do espectro obtido cerca de 1 mês após a síntese deixa claro que este coloide apresentou estabilidade considerável ao longo do tempo. Característica que pode ser estendida às demais sínteses.

#### 4.2. ATIVIDADE SERS DO AgNP8

O espectro mostrado na figura 10 foi obtido utilizando o coloide AgNP8 misturado a uma solução de MPy  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  a fim de verificar a atividade SERS do substrato para radiação excitante em 1064 nm. Observou-se que a coloração azulada do coloide desapareceu e a suspensão tornou-se incolor, ou seja, a presença da molécula induziu a formação de aglomerados os quais permitiram a criação de *hot spots* (pontos entre duas AgNPs próximas onde pode-se atingir valores gigantes de campo elétrico induzido por campo elétrico externo).

Figura 10 – Espectro SERS da MPy ( $10^{-5}$ M) em AgNP8.



Legenda: Radiação excitante: 1064 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Este espectro foi obtido apenas após sucessivas centrifugações, evidenciando que as mesmas espécies que garantem a estabilidade do coloide a longo prazo, boqueiam a superfície e impedem que outras moléculas possam adsorver.

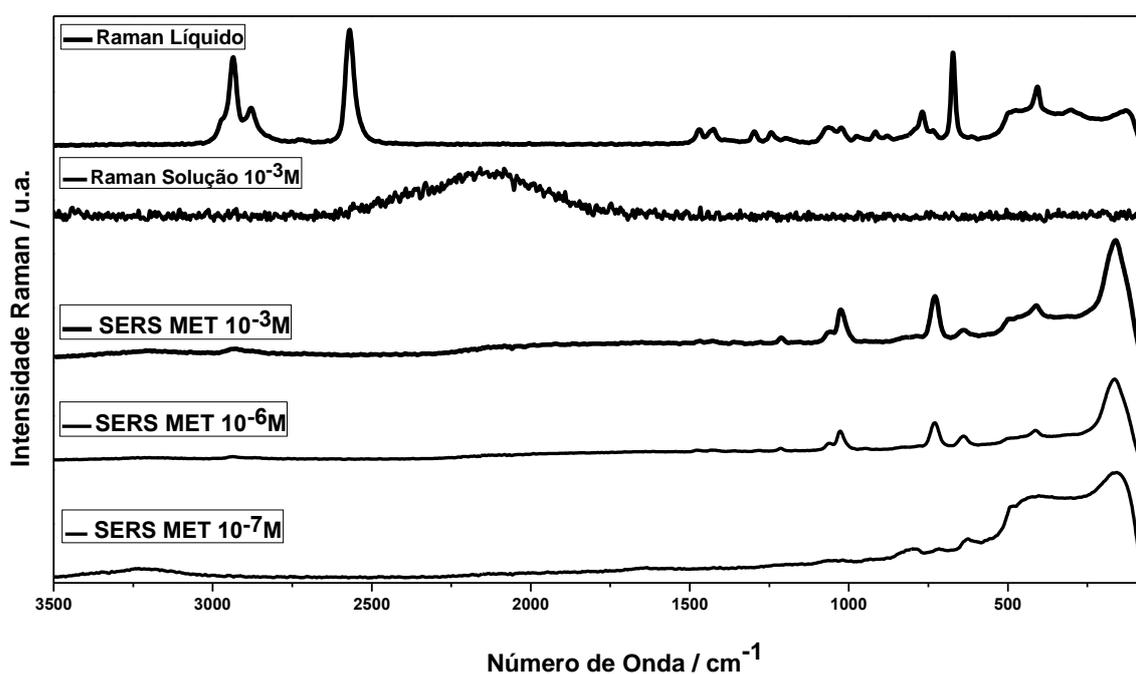
A MPy pode adsorver através do nitrogênio do anel ou através do enxofre. O espectro SERS é sensível a esta diferença na adsorção da molécula. A presença da banda em  $1097\text{ cm}^{-1}$  é considerada determinante para atribuir a adsorção da molécula através do átomo de enxofre. Esta banda é atribuída ao estiramento CS. Enquanto que em 1004, 1581 e 1616 são modos referentes aos estiramentos CC do anel. A intensificação da banda em 1616 pode ser interpretada como um indicativo da protonação do nitrogênio (Jung, Kim e Kim, 1997; Hu *et al.*, 2002).

#### 4.3. ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA ADSORÇÃO DO MET EM AgNP8.

Nesta seção será discutida a adsorção do MET em AgNP utilizando a espectroscopia SERS e Raman. Primeiramente, obteve-se o espectro Raman da molécula de interesse em seu estado líquido (Figura 11). Neste espectro as bandas mais intensas são assim atribuídas:  $665\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{CS})$  da conformação gauche,  $761\text{ cm}^{-1}$  ao  $\nu(\text{CS})$  da conformação trans,

1016  $\text{cm}^{-1}$  ao  $\nu(\text{CCO})$ , 2556  $\text{cm}^{-1}$   $\nu(\text{SH})$  e 2933  $\text{cm}^{-1}$  ao  $\nu(\text{CH})$ . O estiramento CS da molécula é sensível à conformação assumida por ela, neste experimento podemos observar a presença dos dois isômeros rotacionais na fase líquida. Contudo, ao se comparar o espectro Raman do líquido com os espectros SERS obtido em coloide de prata, nota-se a mudança no perfil dos espectros gerado pela ausência da intensificação das bandas em 2566 e 2933  $\text{cm}^{-1}$ , bem como à mudança na razão de intensidade entre as bandas das diferentes conformações.

Figura 11 – Espectros Raman e SERS do MET.



Legenda: Todos os espectros foram obtidos sob a radiação excitante de 1064 nm.

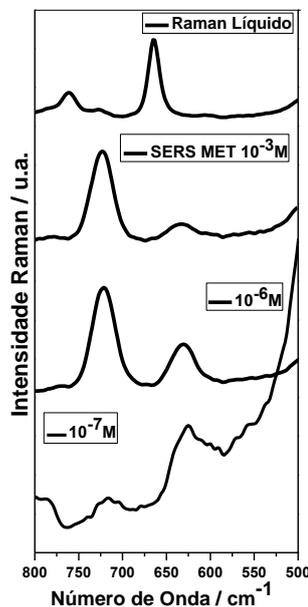
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A ausência da banda em 2566  $\text{cm}^{-1}$  no espectro das espécies próximas à superfície indica a formação da, já esperada, ligação coordenada entre o metal e enxofre desprotonado. Por outro lado a banda referente ao  $\nu(\text{CH})$  não desaparece, mas se mostra muito pouco intensa no espectro, o que é um perfil típico deste modo na espectroscopia SERS. Por último, o espectro do MET em solução aquosa não apresenta bandas do composto e, desta forma, torna claro a intensificação provocada pela presença das AgNPs (Kudelski, 2003a).

Na figura 12 reduziu-se a faixa do espectro para enfatizar as bandas associadas à conformação do adsorbato. Ambas as bandas apresentaram deslocamento comparando-se o espectro Raman (665 e 761  $\text{cm}^{-1}$ ) com o SERS (632 e 723  $\text{cm}^{-1}$ ). Este fato pode ser atribuído à ligação do átomo de enxofre com a superfície metálica, formando um complexo de superfície. Como ocorreu um deslocamento para menores números de onda, pode-se inferir que houve uma

redução na densidade eletrônica da ligação C-S (Tarabara, Nabiev e Feofanov, 1998; Kudelski, 2003a).

Figura 12 – Espectros Raman e SERS do MET na região entre 800 e 500  $\text{cm}^{-1}$ .

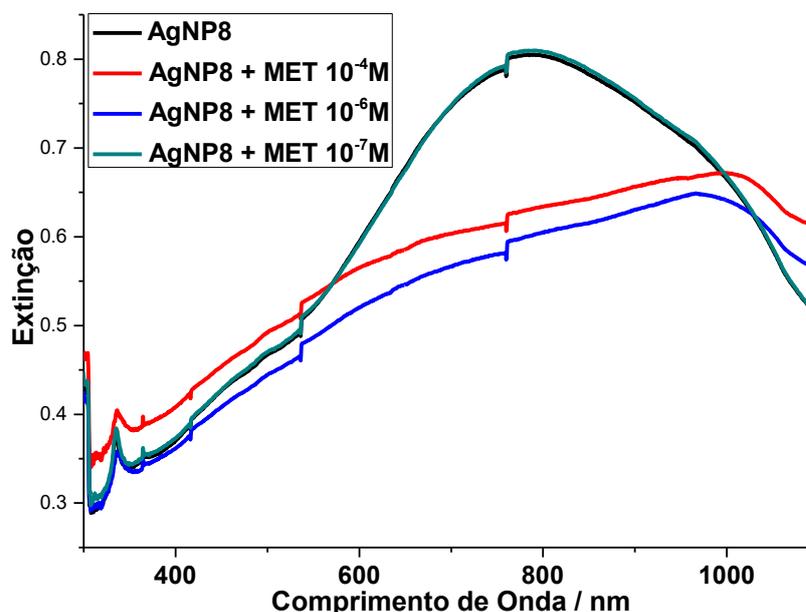


Legenda: Destaque para as bandas de estiramento C-S das conformações gauche e trans.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Um aspecto de muita relevância para a adsorção consiste no efeito da concentração da solução de MET utilizada. Pode-se notar que a razão de intensidade entre as bandas muda conforme a redução da concentração. Isto nos faz supor que a conformação gauche se mostra mais favorável em concentrações de submonocamada por sua conformação possibilitar maior interação com a AgNP do que a outra conformação. Por outro lado, o aumento da concentração leva à predominância da forma trans, que provavelmente se torna favorável por moléculas da monocamada interagirem melhor entre si, ou com moléculas de uma segunda camada por ligações de hidrogênio. Uma maneira de se explicar a intensificação dos espectros com concentração maior que  $10^{-7}\text{M}$  se dá pela formação de dímeros de AgNP, induzida pela adsorção do MET e conseqüentemente remoção da camada protetora do metal, criando *hot spots*. É conhecido que tais moléculas podem formar ligações de hidrogênio e por isso permitiriam que as partículas se aglomerassem. Tal proposta é corroborada visualmente quando observa-se a mudança de cor do coloide de azul para incolor. Afim de reforçar esta hipótese foi realizado o espectro UV-VIS do coloide na presença de diferentes concentrações de MET (Figura 13).

Figura 13 – Espectros UV-VIS da AgNP8 em presença de MET sob diferentes concentrações



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na figura 13 observa-se que concentrações superiores a  $10^{-7}M$  leva ao acoplamento de plasmons, isto é, formação de aglomerados de partículas que deslocam o plasmon para maior comprimento de onda e possibilitam a formação de pontos com grande intensificação do efeito Raman. Em concentração de  $10^{-7}M$ , o espectro das AgNPs é muito semelhante ao espectro da mistura coloide e MET, que corresponde à submonocamada.

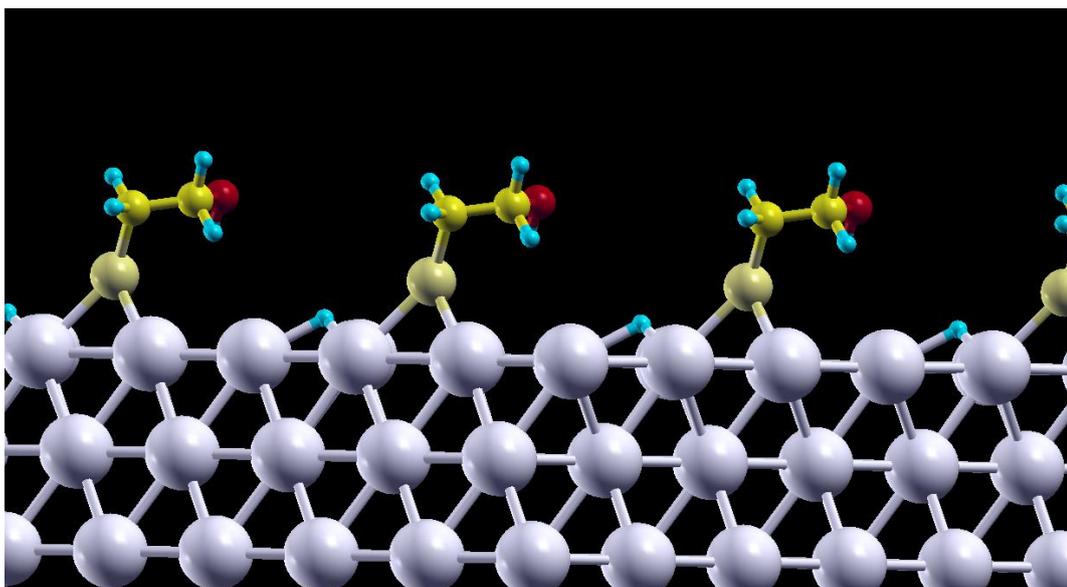
#### 4.4. ESTUDO TEÓRICO DA ADSORÇÃO DO MET EM SUPERFÍCIE 111 DE PRATA.

O estudo teórico a seguir vem trazer novas informações para o entendimento da formação da submonocamada molecular de MET. O objetivo é tanto complementar informações que não são possíveis de extrair de um espectro vibracional, como trazer novas informações sobre as conformações possíveis.

Primeiramente, foi realizada a construção da superfície de prata, utilizando uma célula unitária  $3 \times 3 \times 3$  e otimizada a última camada de átomos. Em sequência, executou-se tanto a construção do MET, como sua otimização no vácuo, posteriormente, foi efetuada a otimização de geometria da molécula adsorvida na superfície de prata 111 para as diferentes conformações. A camada mais externa, a qual interage com a molécula, foi otimizada juntamente com o adsorbato. Como pode ser visto nas Figuras a seguir (14 e 15), esta superfície de estudo oferece 4 sítios de adsorção possíveis: Único átomo, ponte, buraco fcc e buraco hcp. Foram testados os

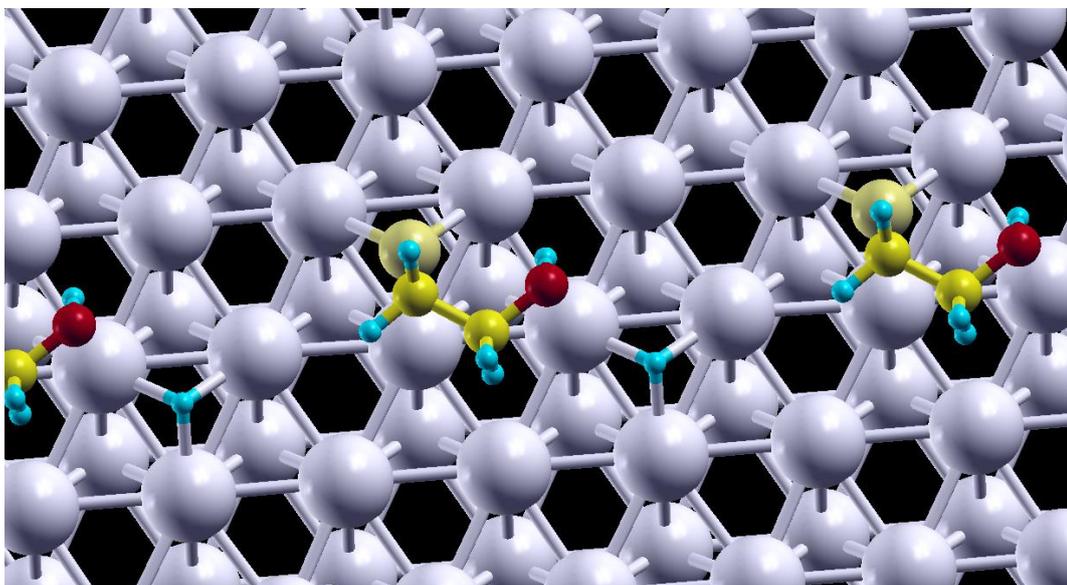
diferentes sítios e verificou-se dois sítios preferenciais para a adsorção, sendo um para cada conformação. Em um primeiro momento foi realizada uma tentativa de adsorção da molécula sem a dissociação do próton, a qual não se mostrou favorável, considerando apenas a energia eletrônica. Assim sendo, confirmou-se que o desaparecimento da banda de  $\nu(\text{SH})$ , no espectro SERS, refere-se realmente à clivagem desta ligação com a adsorção da molécula à superfície da AgNP.

Figura 14 – Visão lateral da adsorção do MET (gauche).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 15 – Visão superior da adsorção do MET (gauche).

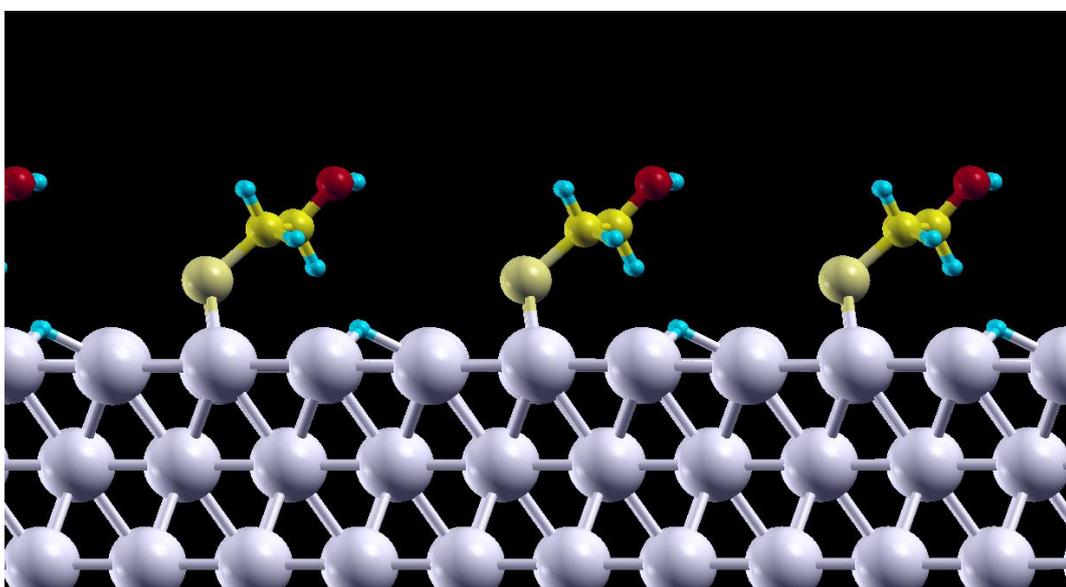


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nas figuras 14 e 15, somos capazes de identificar que o sítio de adsorção da espécie gauche é o buraco fcc. A molécula adsorve através do átomo de enxofre e a conformação gauche deve possibilitar uma maior interação entre o grupo OH da molécula e a superfície.

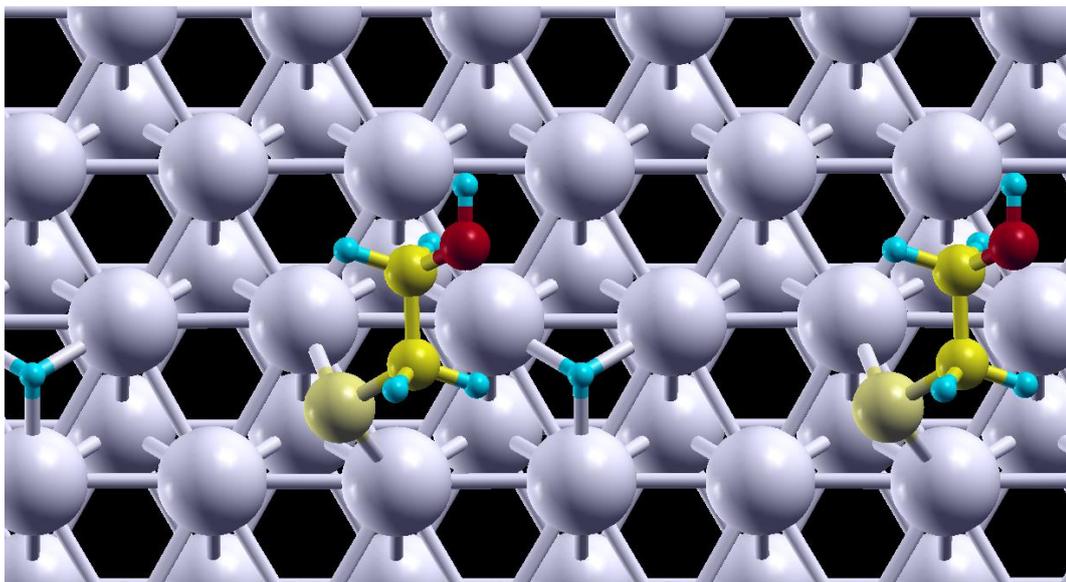
A conformação trans se mostrou mais favorável ao adsorver em ponte (Figuras 16 e 17). A hidroxila voltada para longe da superfície nos permite associar a predominância desta forma no espectro SERS de soluções mais concentradas por permitir a formação de ligações de hidrogênio com outras moléculas. Esta conformação permite que duas nanopartículas se aproximem por conta das interações intermoleculares e, conseqüentemente, aumentar a intensidade do sinal Raman pela formação de *hot spots*.

Figura 16 – Visão lateral da adsorção do MET (trans).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 17 – Visão superior da adsorção do MET (trans).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A seguir, a Tabela 1 está relacionando dados da literatura do metanotiol adsorvido em superfície de ouro 111.

Tabela 1 – Dados de distância e ângulos da molécula adsorvida.

	<b>dMS</b>	<b>dSC</b>	<b>θMSM</b>	<b>θMSC</b>	<b>θSCCO</b>
SCH <sub>3</sub> + Au(111)*	2,64	1,85	73	124	---
MET(G) + Ag(111)	2,58	1,86	73	132	64
MET(T) + Ag(111)	2,54	1,85	73	116	175

Legenda: d=distância em angstroms; M=átomo Ag ou Au; S= enxofre; C= carbono; θ=ângulo entre os 3 átomos em graus. \*Dado retirado da literatura (Barnard, 2013).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Comparando-se os dados da literatura e os resultados obtidos, observa-se uma semelhança no comportamento das duas moléculas. As diferenças nas conformações provocam deslocamento na banda de estiramento C-S, uma das justificativas propostas na literatura, sugere que a deformação da cadeia S-C-C seja a responsável por isso. Nos dados acima pode-se observar que de fato há uma diferença significativa nos ângulos entre os átomos de metal e o de enxofre, assim como entre os átomos de prata, enxofre e carbono. A última coluna da tabela

refere-se ao ângulo diedro, sendo que os valores encontrados são próximos do modelo de gauche e trans, 60 e 180° respectivamente (Kudelski, 2003a).

A Tabela 2 apresenta dados relativos às energias de adsorção do MET considerando a molécula ou seu respectivo radical. Os resultados mostram que a molécula adsorvida com o hidrogênio nos sítios vizinhos se mostra ligeiramente desfavorável para a conformação trans e ligeiramente favorável para gauche. Por outro lado, o valor de energia para a espécie radicalar se mostra próxima aos valores calculados pela literatura para o metanotiol em superfície de ouro.

Tabela 2 – Energia de adsorção da molécula à superfície (111).

Sistema	$\Delta E_{\text{ads}}$ (kcal/mol)	$\Delta E_{\text{ads}}$ (kcal/mol) Radical
*SCH <sub>3</sub> + Au (111)		-47
MET (Gauche) + Ag (111)	-0,08	-45
MET (Trans) + Ag (111)	0,78	-43

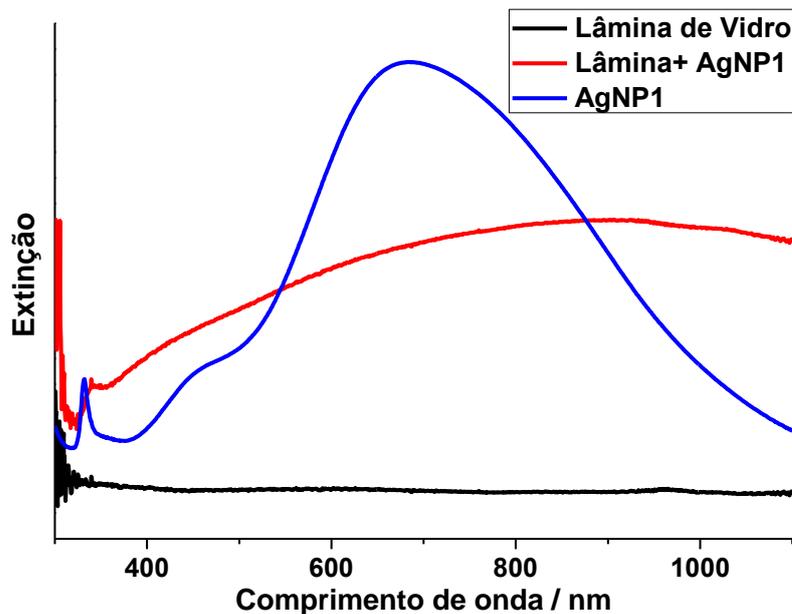
Legenda:  $\Delta E_{\text{ads}} = E_{\text{mol+sup}} - E_{\text{mol}} - E_{\text{sup}}$   $\Delta E_{\text{ads}}$ = Variação de energia associada à adsorção em kcal/mol;  $E_{\text{mol+sup}}$ =Energia da molécula adsorvida à superfície;  $E_{\text{mol}}$ =Energia da molécula isolada;  $E_{\text{sup}}$ =Energia da superfície. \*Dado retirado da literatura (Barnard, 2013). Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Além de apresentar valores energéticos absolutos inferiores à conformação trans, a espécie gauche é também favorecida do ponto de vista de energia de adsorção. A diferença de energia entre as duas espécies se daria pela interação do grupo funcional álcool da molécula com a superfície. Vide que neste tipo de cálculo é levada em consideração apenas a energia eletrônica e que há um vácuo acima da molécula, não um solvente como seria esperado experimentalmente. Apesar das limitações do modelo em representar uma nanopartícula, é notório que há informações pertinentes para se discutir a adsorção da molécula, bem como entender a formação da monocamada molecular. Neste caso o modelo se aproximou principalmente dos resultados obtidos experimentalmente pela espectroscopia SERS em regime de formação de submonocamada, isto é, onde não haja, ou seja desprezível, a interação entre moléculas vizinhas, como é o caso proposto no modelo teórico.

#### 4.5. CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE SERS DO FILME FINO DE PRATA

Na figura 18 são mostrados os espectros UV-VIS da lâmina de vidro sem modificação, da suspensão coloidal (AgNP1) e da lâmina modificada.

Figura 18 – Espectros UV-VIS da lâmina de vidro, do coloide e da lâmina modificada.



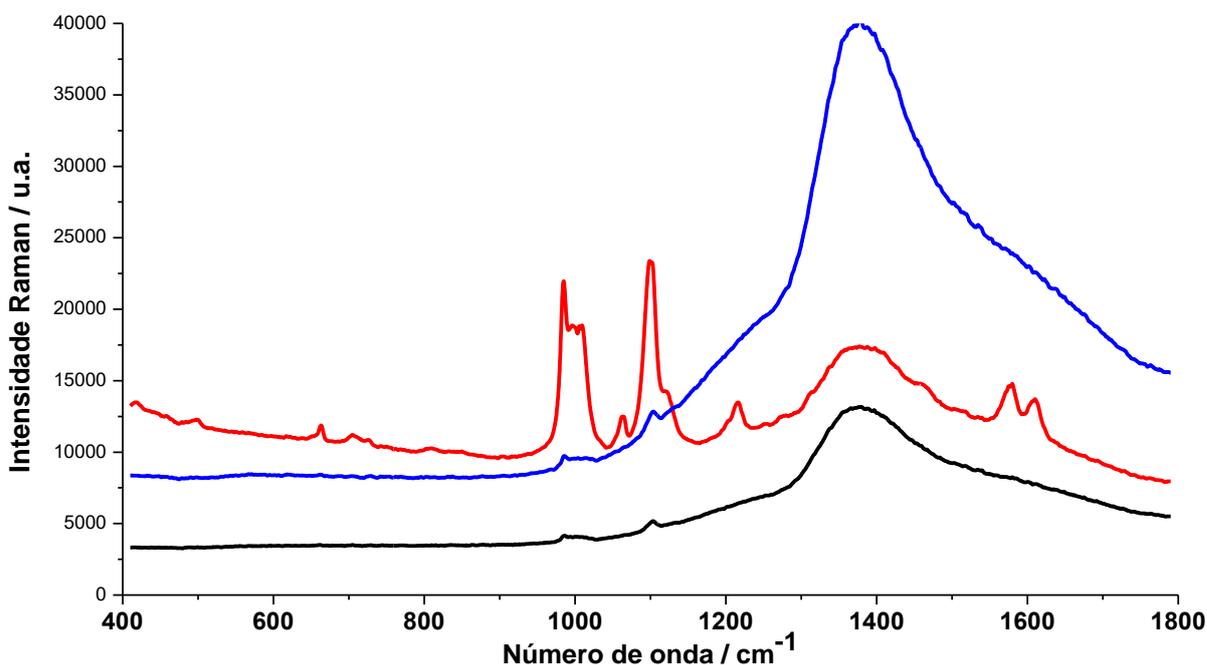
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro da lâmina de vidro não apresentou sinal na região acima de 300 nm e abaixo de 1100 nm. No espectro do coloide observa-se a presença de uma banda LSPR larga com máximo em 687 nm. O resultado ideal seria que o espectro da lâmina modificada apresentasse o mesmo espectro da suspensão coloidal. Contudo, experimentalmente o que foi obtido se diferencia bastante do desejado. Observa-se que o espectro UV-VIS da lâmina modificada apresenta uma banda muito larga em toda a região do visível, contudo próximo a 330 nm ambos, coloide e lamina modificada, apresentam o mesmo comportamento com a presença da transição de quadrupolo fora do plano associada aos nanodiscos. Este perfil de espectro sugere que as partículas se encontram próximas no substrato de vidro e por isso haja o acoplamento dos plasmons de superfície, que leva ao deslocamento da banda LSPR para o infravermelho próximo.

Foram realizadas medidas para a obtenção do espectro SERS com o substrato construído. Novamente foi utilizado a MPy como molécula de prova.

A figura 19 mostra 3 espectros obtidos de diferentes pontos da mesma lâmina modificada. Em todos os espectros pode-se ver algumas bandas características da presença da molécula. Outro ponto comum, consiste na banda larga com máximo em cerca de  $1380\text{ cm}^{-1}$ .

Figura 19 – Espectros SERS da MPy ( $1.10^{-5}M$ ) em filme fino de prata de diferentes pontos do substrato.



Legenda: Utilizou-se a linha laser em 785 nm. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

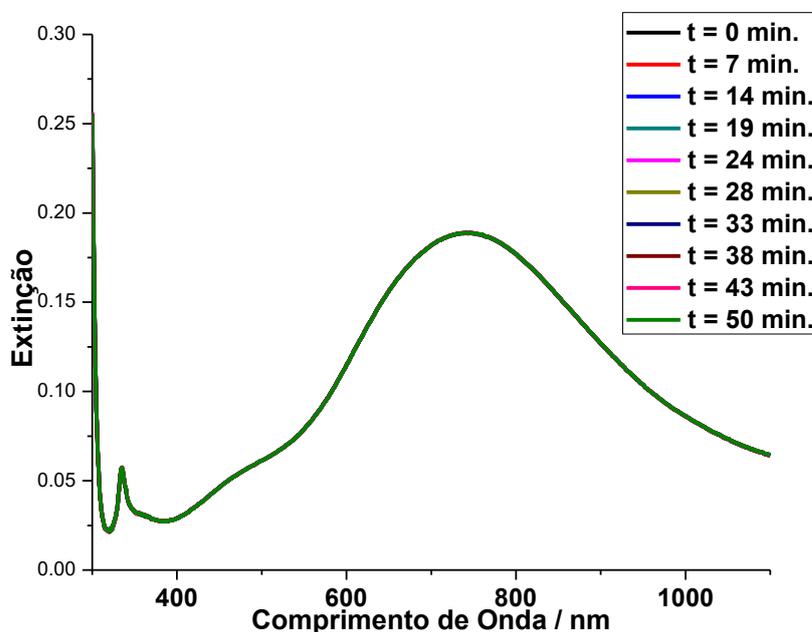
A presença da banda em  $1097\text{ cm}^{-1}$  é considerada determinante para atribuir a adsorção da molécula através do átomo de enxofre (Jung, Kim e Kim, 1997). Contudo, há de se observar que a banda larga (entre  $985$  e  $1008\text{ cm}^{-1}$ ) se dá pela presença de bandas atribuídas tanto pela molécula adsorvida pelo enxofre, bem como quando o anel aromático está paralelo à superfície do filme fino (Jung, Kim e Kim, 1997; Hu *et al.*, 2002). Logo, pode-se inferir que a adsorção ocorre por coordenação do átomo de enxofre com a superfície metálica, mas também por interações da nuvem  $\pi$  com o metal. Por último, a banda larga na região  $1380\text{ cm}^{-1}$  é um artefato do equipamento, presente em espectros com baixa intensidade.

#### 4.6. ESTUDO CINÉTICO DA INTERAÇÃO ENTRE AgNP8 E O D-Trp

Um dos objetivos principais deste trabalho consiste na obtenção dos espectros SERS de diferentes peptídeos, portanto como ponto de partida foi realizada a mistura da solução de D-Trp com o coloide de prata AgNP8. A princípio nenhuma mudança de cor foi observada. A interação das AgNPs com o D-Trp foi acompanhada no tempo através da espectroscopia UV-VIS (Figura 20). A sobreposição dos espectros permite inferir que não há interação significativa entre as nanopartículas e o adsorbato no intervalo de tempo considerado. O experimento para obtenção do espectro SERS deste aminoácido foi realizado, contudo nenhum sinal foi obtido,

em outras palavras, o espectro obtido se assemelhou ao espectro do coloide, de forma que eles ficaram sobrepostos na Figura 20..

Figura 20 – Espectros UV-VIS da AgNP8 em presença de D-Trp ( $10^{-3}M$ ).



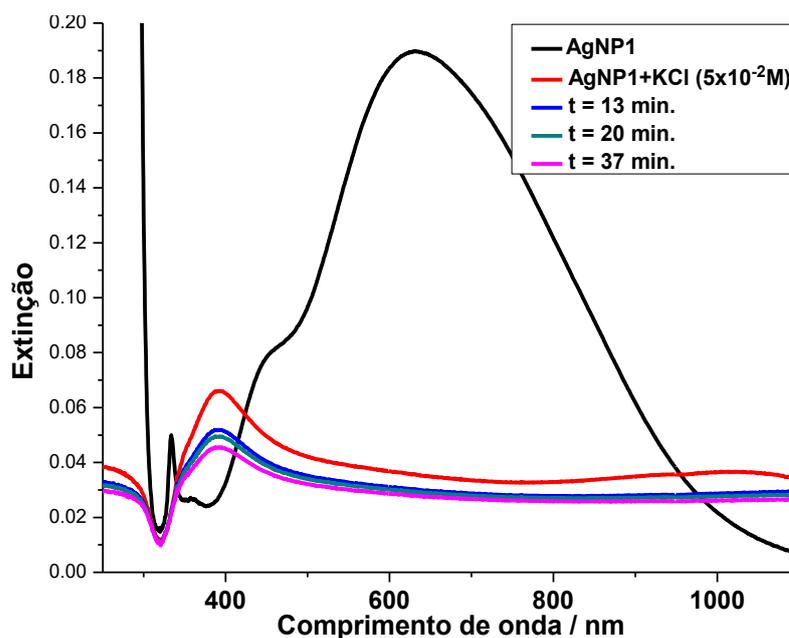
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O resultado nos permite inferir que não há interação ou uma afinidade muito pequena entre o D-Trp e as AgNP8, visto que não há nenhum deslocamento na banda.

#### 4.7. ESTUDO CINÉTICO DE AgNP1 EM PRESENÇA DE KCl

Na literatura há diversos relatos do uso de KCl para auxiliar na intensificação do espectro. Esta estratégia alternativa foi utilizada na expectativa de que levasse a uma agregação controlada, contudo, visualmente o que foi observado foi a mudança da cor azul para amarelo, o que remete à presença de AgNPs pequenas (em torno de 10 a 15 nm). Este fato inesperado e interessante ocasionou o estudo espectroscópico a seguir. Na Figura 21 temos o coloide AgNP1 misturado em partes iguais com o KCl, a fim de observar o efeito da mistura, como também a evolução ocorrida com o tempo.

Figura 21 – Espectros UV-VIS do AgNP1 na presença de KCl ( $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ).



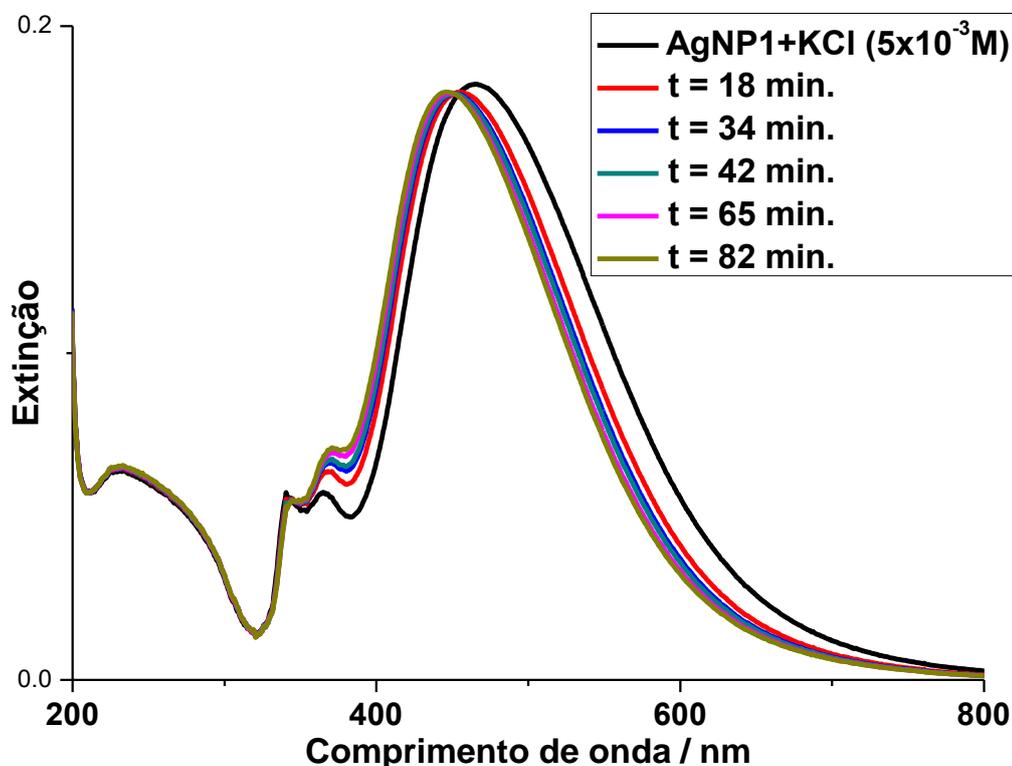
Legenda: Tempo em minutos. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A adição da solução de cloreto de potássio ao coloide modificou completamente o espectro, uma das mudanças é o aumento de intensidade na região de 950 nm em diante, o que nos sugere aglomeração das partículas. Por outro lado, observa-se que há o surgimento de uma banda em 400 nm que geralmente é característica de nanoesferas entre 10 e 20 nm. Com o avanço do tempo, observa-se a redução na intensidade das bandas em toda a região do espectro. Apenas com essas informações não é possível dizer com precisão o que está acontecendo, mas pode-se afirmar que há o desaparecimento dos prismas pela ausência das bandas características e a aglomeração das partículas. Vale destacar que não é de conhecimento do autor a existência de algum relato semelhante na literatura.

Outro estudo cinético foi conduzido sob condições semelhantes, apenas com alteração na concentração do KCl em uma ordem de grandeza menor que a anterior (Figura 22). Neste caso a banda de maior intensidade aparece em torno de 465 nm e com o passar do tempo avança para 446 nm. Os espectros não indicam a formação de aglomerados de AgNPs, vide que a intensidade, em maiores comprimentos de onda, é reduzida a valores insignificantes. Há ainda o aparecimento de uma banda na região do ultravioleta em 365 nm a qual supõe-se ser atribuída ao quadrupolo da espessura, que no espectro da figura 16 se encontra em 333 nm. Os prismas têm por característica apresentar bandas LSPR do dipolo no plano deslocadas para o infravermelho, devido à razão de aspecto das suas dimensões. Uma hipótese para o fenômeno observado é que esteja ocorrendo o empilhamento dos prismas, fazendo com que ocorra a diminuição da razão de aspecto e, conseqüentemente, deslocando o máximo para o azul. Essa

mesma hipótese pode explicar o deslocamento da banda LSPR do quadrupolo fora do plano para maior comprimento de onda pelo aumento da espessura.

Figura 22 – Espectros UV-VIS do AgNP1 na presença de KCl ( $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ )



Legenda: Tempo em minutos. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Comparando o comportamento de AgNP1 sob diferentes concentrações de KCl (Figura 21 e 22), pode-se sugerir que em concentrações de  $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$  ou maiores, haverá tanto a formação de aglomerados de partículas tão grandes que não irão apresentar absorção de radiação na região de interesse, quanto a transformação dos prismas em nanopartículas menores. Por outro lado a concentração de  $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$  leva ao empilhamento dos prismas e consequente deslocamento da banda para regiões de menor comprimento de onda. A introdução do cloreto de potássio se mostrou ineficiente para promover uma agregação controlada e, conseqüentemente, auxiliar na obtenção do espectro SERS na região espectral do vermelho e infravermelho próximo.

#### 4.8. CARACTERIZAÇÃO DO AgCuNP

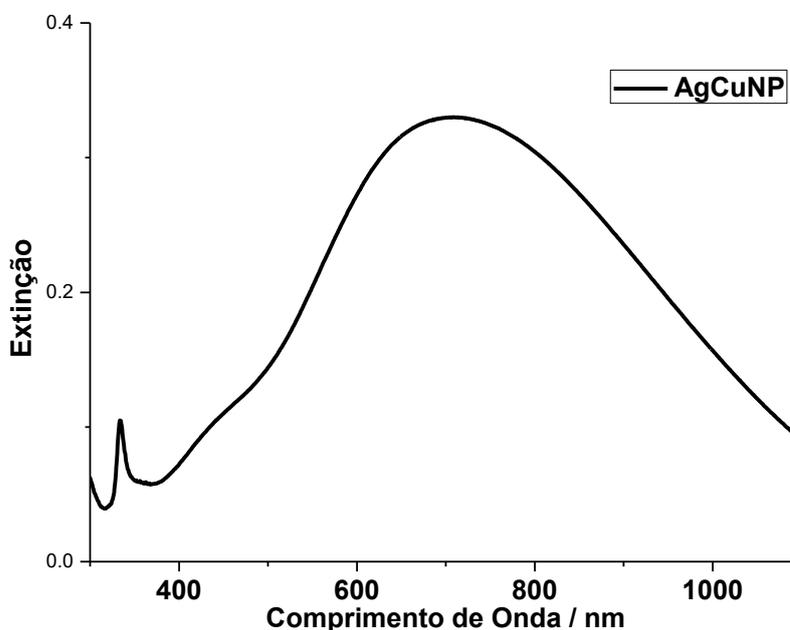
Uma das estratégias alternativas para a obtenção dos espectros SERS dos oligopeptídeos com radiação excitante na região do vermelho ou do infravermelho consistiu na

síntese de nanoprismas de prata dopados com cobre. Este método de síntese tem uma peculiaridade muito interessante, pois foi inspirada tanto por um trabalho experimental envolvendo a dopagem de nanoprismas de prata, como por um trabalho teórico investigando nanoestruturas de prata e cobre (Shin *et al.*, 2012; Tsuji *et al.*, 2013). Vale destacar que não há registro de tal síntese na literatura.

A síntese foi realizada sob condições semelhantes às empregadas para a obtenção da AgNP1. Observou-se que o coloide assumia uma coloração amarela inicialmente, típica da formação das partículas precursoras. Passados alguns minutos e a coloração se modificava, até chegar a um tom de azul. Comportamento semelhante ao coloide de prata sintetizado anteriormente.

A obtenção do espectro UV-VIS do coloide (Figura 23) pôde confirmar a formação de prismas. A banda LSPR referente ao dipolo no plano apresenta máximo na região de 709 nm. O ombro em 470 nm é caracterizado por uma composição entre o dipolo fora do plano e o quadrupolo no plano. Já na região do ultravioleta pode-se visualizar uma banda estreita característico do quadrupolo fora do plano.

Figura 23 – Espectro UV-VIS do coloide AgCuNP

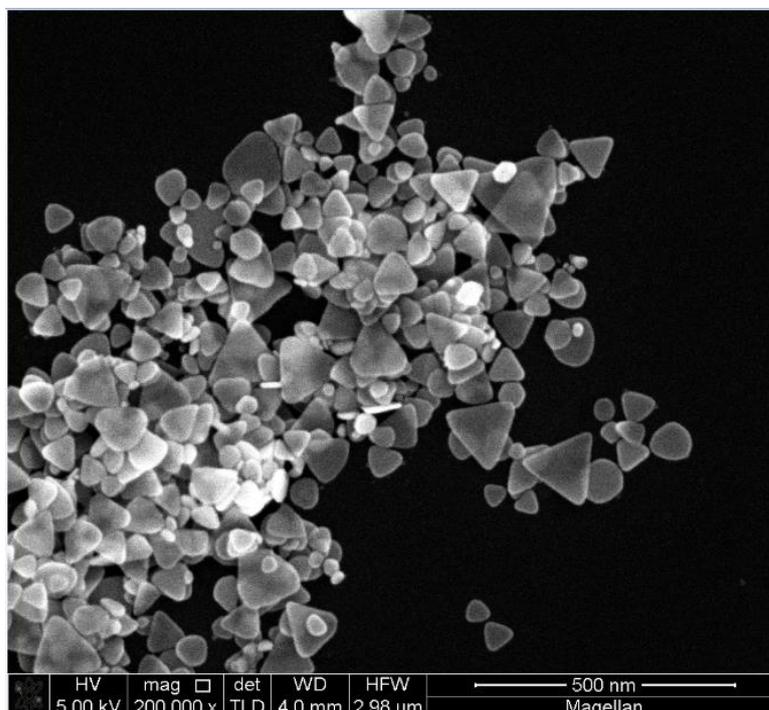


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Figura 24 é mostrada uma das imagens de microscopia eletrônica de varredura, na qual é possível constatar a formação de vários prismas. Qualitativamente, a síntese sob a presença de cobre mostra-se com maior rendimento de nanoprismas triangulares do que a

síntese original. Estas AgNPs aparentam ser finas, a tal ponto de ser possível observar a sobreposição entre elas, na micrografia. Esta característica está relacionada diretamente com o espectro UV-VIS, pois quanto maior a razão de aspecto entre as dimensões, maior o deslocamento da banda LSPR. A banda larga no espectro UV-VIS sugeria a formação de partículas com grande distribuição de tamanho. Tal fato pode ser comprovado pela micrografia. Há partículas com tamanho em torno de 30 nm e outras possuindo mais de 100 nm. Outra característica interessante como substrato SERS é a formação de triângulos com pontas muito bem definidas, o efeito de ponta é um dos fatores importantes para intensificação do campo elétrico local.

Figura 24 – Micrografia do AgCuNP.



Legenda: Imagem obtida por um microscópio eletrônico de varredura.

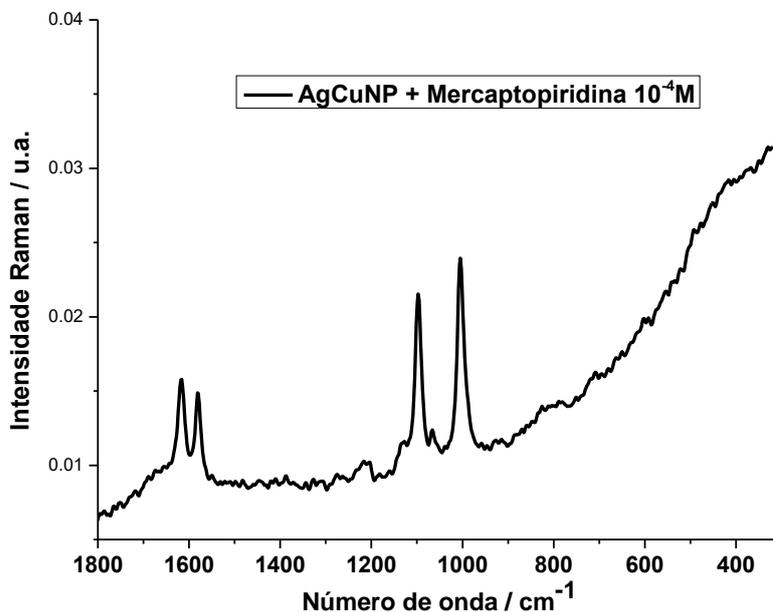
Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

#### 4.9. ATIVIDADE SERS DO AgCuNP

Na Figura 25 tem-se o espectro SERS da MPy ( $10^{-4}$ M) obtida em presença de AgCuNP. O experimento foi realizado a fim de verificar a atividade SERS do coloide sintetizado, utilizando a radiação excitante de 1064 nm. A presença da banda em  $1097\text{ cm}^{-1}$  é importante para afirmar que a adsorção da molécula à superfície de prata ocorre através do átomo de enxofre. Esta banda é atribuída ao estiramento CS. Enquanto que, em 1004, 1581 e 1616 são modos referentes à respiração e estiramentos CC do anel. Por último, a intensificação

da banda em 1616 é um indicativo da protonação do nitrogênio (Jung, Kim e Kim, 1997; Hu *et al.*, 2002).

Figura 25 – Espectro SERS da MPy ( $10^{-4}$ M) em AgCuNP.



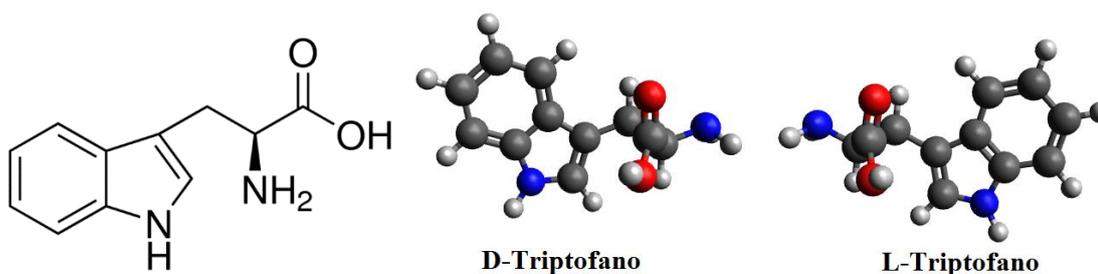
Legenda: Radiação excitante em 1064 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.10. ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO L-Trp E DO D-Trp

Nesta seção serão discutidos os resultados envolvendo os dois isômeros ópticos, L-Trp e D-Trp. Serão analisados e comparados os espectros Raman, SERS e LSPR. Na figura 26, encontra-se uma representação do triptofano juntamente com uma comparação entre a estrutura de ambos os isômeros.

Figura 26 – Representação do Triptofano e comparação entre os isômeros.

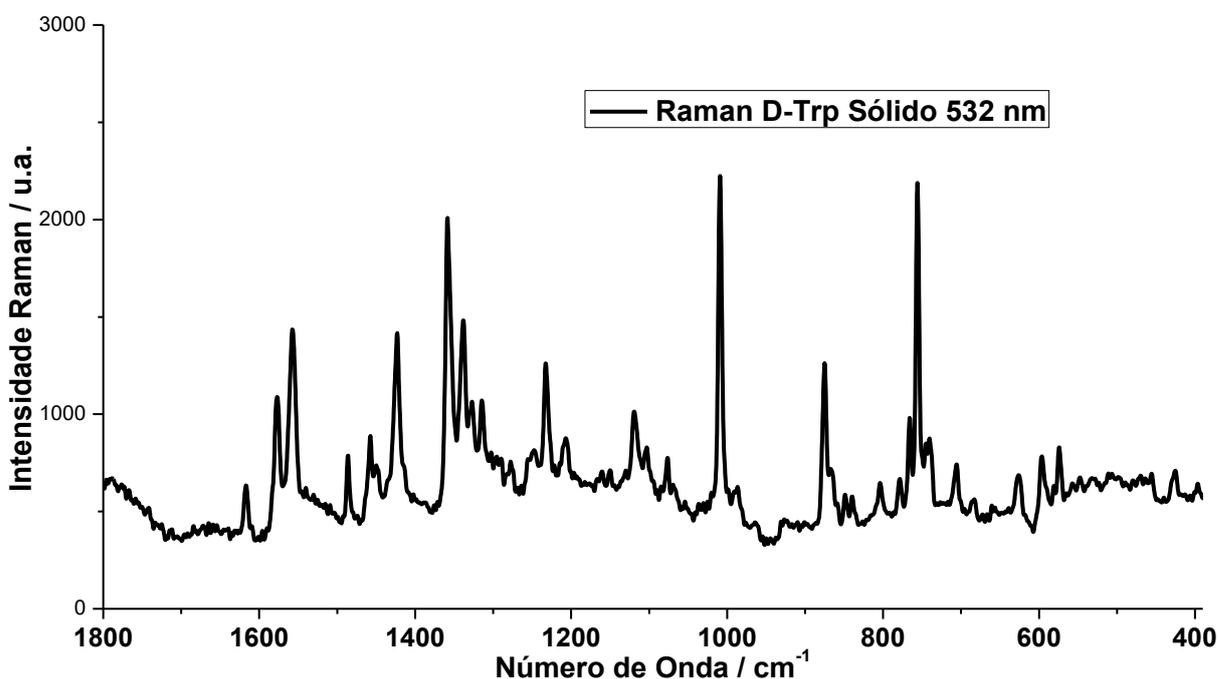


Legenda: Azul: Nitrogênio; Vermelho: Oxigênio; Cinza: Carbono; Branco: Hidrogênio.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A Figura 27 apresenta o espectro Raman do D-Trp em estado sólido excitado pela radiação em 532 nm. Na região entre 400 e 700  $\text{cm}^{-1}$  observa-se um conjunto de bandas de baixa intensidade, onde 425, 574 e 596  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas a deformações angulares fora do plano envolvendo o anel indólico. Entre 700 e 900  $\text{cm}^{-1}$ , destacam-se as bandas intensas em 756, referente à respiração do anel, e 875  $\text{cm}^{-1}$ , deformação angular de hidrogênio do anel, além de uma banda fraca em 804  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento envolvendo o grupo carboxílico. As bandas em 923, 1009, 1119 e 1150  $\text{cm}^{-1}$ , destaques entre 900 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ , são atribuídas a deformação angular da amina, respiração, estiramento carbono-carbono do anel e deformação angular da amina, respectivamente. De 1200 a 1400  $\text{cm}^{-1}$ , as bandas de maior intensidade são 1233, deformação angular do anel, 1337 e 1359  $\text{cm}^{-1}$  é um dubleto atribuído ao estiramento CC e CN do anel (Harada, Miura e Takeuchi, 1986). Na região entre 1400 e 1600, estão presentes bandas intensas como 1423, 1557 e 1577  $\text{cm}^{-1}$ , todos envolvendo estiramento de átomos do indol. A última região apresenta uma banda significativa, em 1620  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupo ácido.

Figura 27 – Espectro Raman do D-Trp em estado sólido.



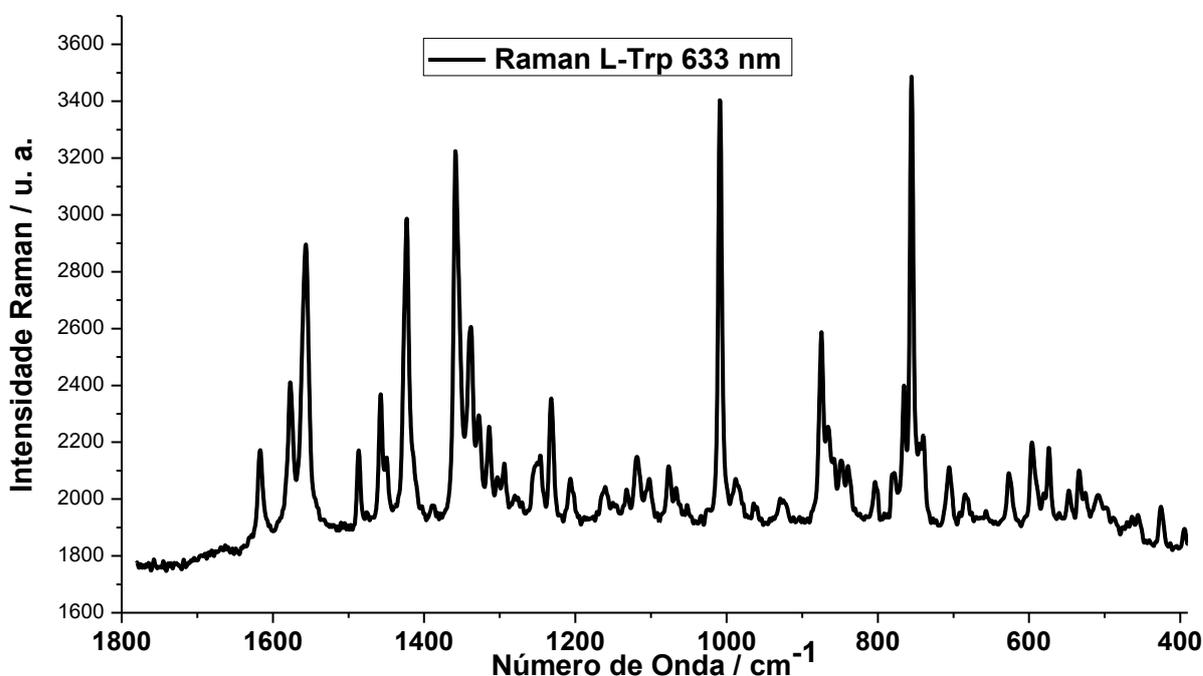
Legenda: Radiação excitante em 532 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Figura 28 pode-se observar o espectro Raman do L-Trp em estado sólido excitado pela radiação em 532 nm. A região entre 400 e 700  $\text{cm}^{-1}$  apresenta bandas de baixa intensidade, onde destacam-se 425, 574 e 596  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a deformações angulares fora do plano envolvendo o anel indólico. Destacam-se as bandas intensas em 756, referente à

respiração do anel, e  $875\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de hidrogênio do anel, além de uma banda fraca em  $804\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento envolvendo o grupo carboxílico, na região entre  $700$  e  $900\text{ cm}^{-1}$ . Destacam-se, entre  $900$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ , as bandas em  $923$ ,  $1009$ ,  $1119$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$ , as quais são atribuídas a amina, respiração, estiramento carbono-carbono do anel e amina, respectivamente. Entre  $1200$  a  $1400\text{ cm}^{-1}$ , as bandas de maior intensidade são  $1233$ , deformação angular CH do anel,  $1337$  e  $1359\text{ cm}^{-1}$ , um dubleto atribuído ao estiramento carbono-carbono do anel (Harada, Miura e Takeuchi, 1986). Observando a faixa de  $1400$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , estão presentes bandas intensas como  $1423$ ,  $1557$  e  $1577\text{ cm}^{-1}$ , todos envolvendo estiramento de átomos do indol. A última região apresenta uma banda em  $1620\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao grupo ácido.

Figura 28 – Espectro Raman do L-Trp em estado sólido.



Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

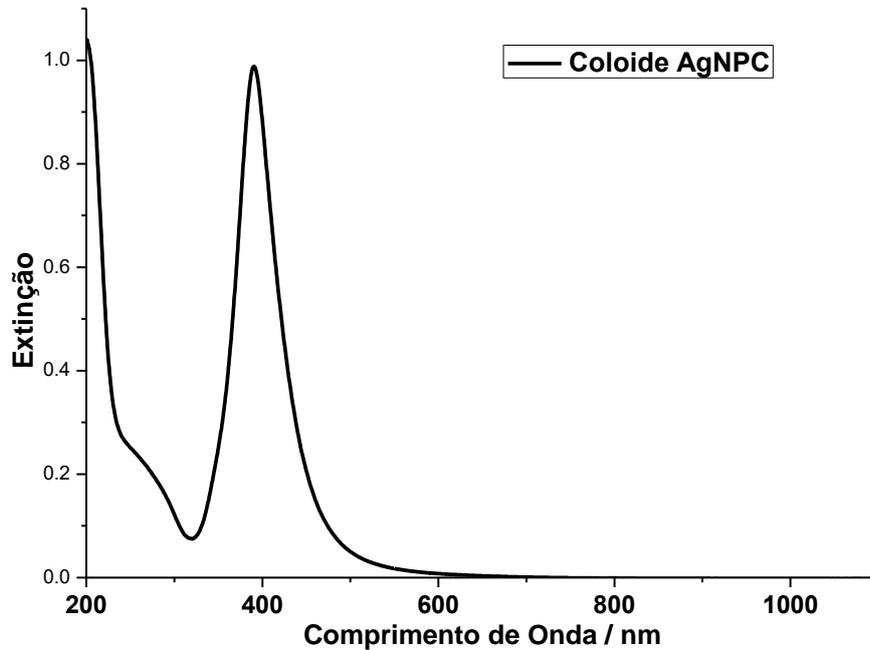
Os espectros Raman das moléculas em estado sólido mostram-se muito semelhantes um ao outro, não possuindo evidências para diferenciação entre os isômeros ópticos. Além disso, pode-se destacar a predominância de bandas atribuídas ao anel.

#### 4.10.1. LSPR e SERS do Trp em AgNPC

A Figura 29 mostra um espectro LSPR da AgNPC sintetizada. A banda em torno de  $390\text{ nm}$  está associada à presença de pequenas (ca.  $10\text{ nm}$ ) nanopartículas esféricas de prata,

pela largura da banda espera-se que a microscopia eletrônica permita observar partículas com pequena dispersão de tamanhos.

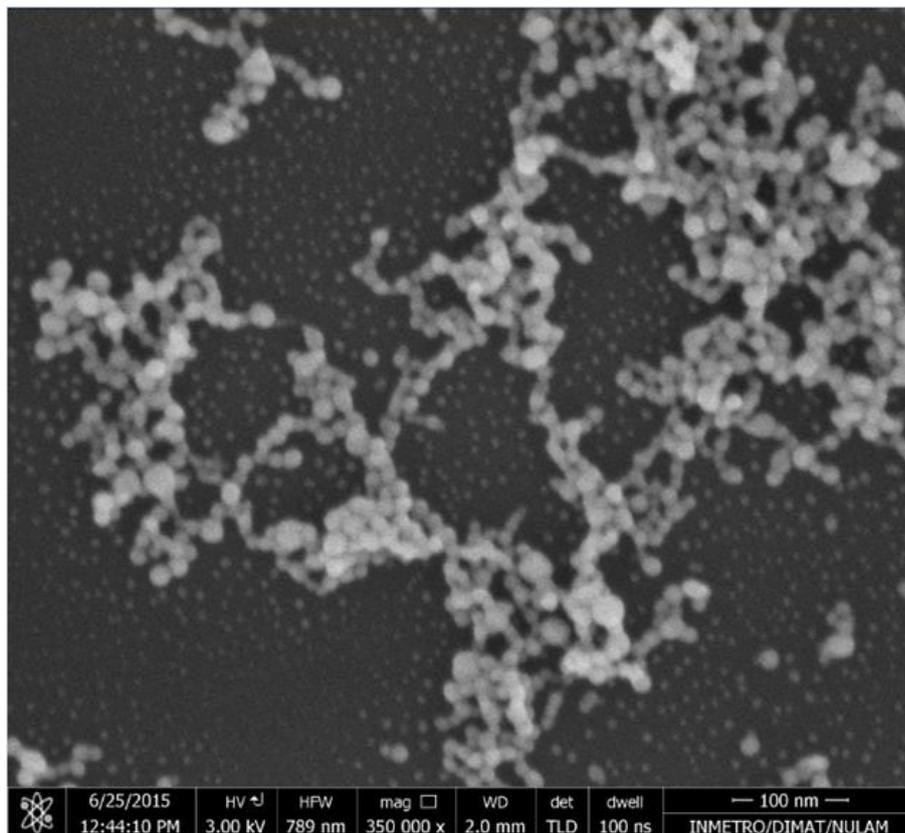
Figura 29 – Espectro LSPR do coloide AgNPC.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Uma das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura é apresentada na Figura 30. Observa-se a presença de AgNPs esféricas, com tamanho de cerca de 15 nm. A imagem corrobora as informações do espectro obtido, considerando que esperava-se nanoesferas pequenas de prata com dispersão pequena de tamanhos. Infelizmente, as imagens não estão bem resolvidas, o que impediu a realização de uma descrição mais detalhada do coloide.

Figura 30 – Micrografia do coloide AgNPC.

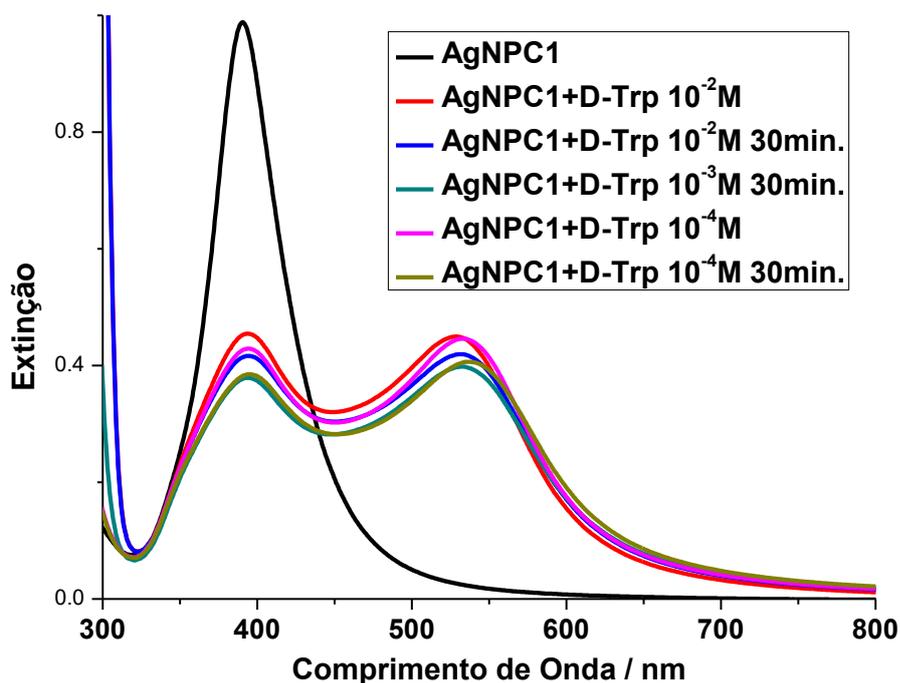


Legenda: Micrografia realizada em um microscópio eletrônico de varredura.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Posteriormente à caracterização do coloide, foi realizado o estudo espectroscópico do D-Trp na presença de AgNPs. Primeiramente, foi obtido o espectro UV-VIS do coloide, a fim de verificar se ocorre alguma modificação na banda LSPR, a qual pudesse ser um indicativo de interação da molécula com a superfície. O coloide deixou de ter uma coloração amarela, passando para vermelha. Mesmo após a mistura, os espectros (Figura 31) ainda apresentam a banda em 390 nm. Enquanto que a diferença se dá pelo surgimento de banda na região de 535 nm.

Figura 31 – Espectros LSPR da AgNPC em presença de D-Trp



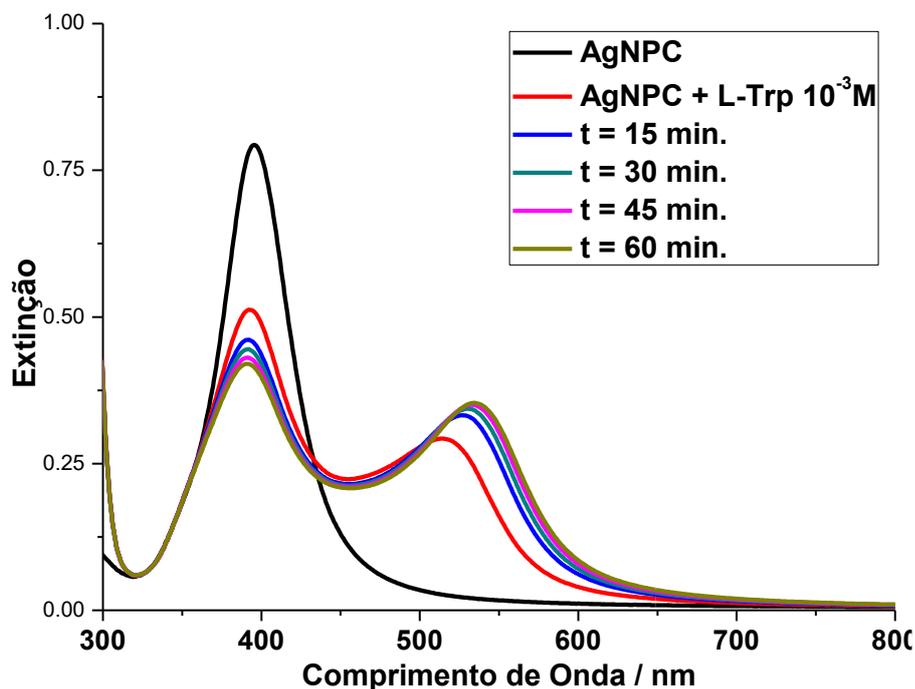
Legenda: Tempo em minutos.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os espectros obtidos não mostram grandes diferenças entre as concentrações, ou com o tempo após a adição da molécula ao coloide. O perfil gerado pela mistura coloide-aminoácido se faz interessante, pois sugere a formação de aglomerados de AgNPs, ou seja, podem apresentar intensificação do espalhamento Raman pela formação de *hot spots* (dímeros ou trímeros de AgNP).

Na Figura 32 estão representados os espectros LSPR da AgNPC em presença do L-Trp, nela pode-se verificar que há a redução da banda em 390 nm e o surgimento de uma banda em 530 nm. O avanço do tempo mostra que a tendência permanece, porém em uma velocidade menor. A redução de uma banda em menor comprimento de onda, seguido pelo surgimento de uma banda em maior comprimento de onda é um comportamento que nos indica o acoplamento de plasmons entre partículas, ou ainda, a formação de dímeros de nanopartículas provocados pela substituição do borato pelo L-Trp. Nestes dímeros, há a formação de pontos de grande intensificação do efeito SERS pela concentração de campo gerada pelas duas partículas. Tal comportamento é semelhante àquele apresentado pela molécula de D-Trp.

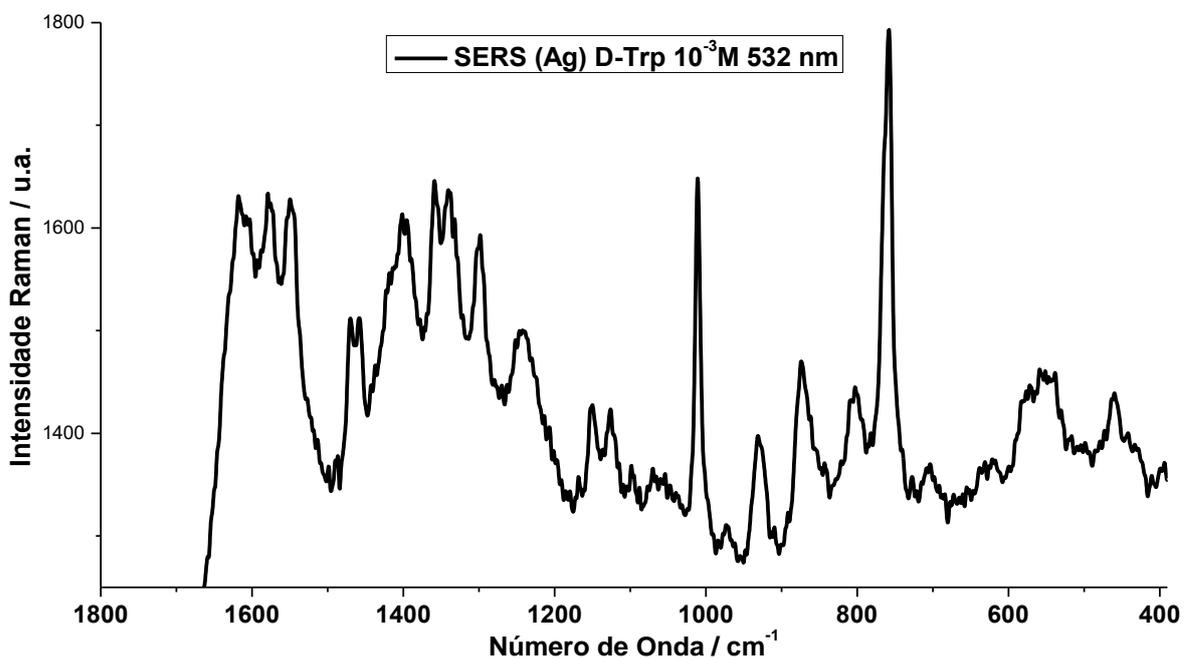
Figura 32 – Espectros LSPR do coloide AgNPC em presença de L-Trp.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro SERS do D-Trp em prata foi obtido pela excitação em 532 nm (Figura 33). As bandas mais intensas do espectro estão em 758, 1011, 1298, 1341, 1359, 1402, 1550, 1579, 1603 e 1618  $\text{cm}^{-1}$ . Ao grupo indol são atribuídos os modos em 758, 1011, 1550, 1579 e 1603  $\text{cm}^{-1}$ , o ácido é responsável por 1402 e 1618. A simples comparação das bandas mais intensas entre os espectros SERS e Raman do sólido nos sugere a adsorção através dos grupos amina e ácido. Outras pistas podem ser obtidas através de uma análise minuciosa do espectro, como a intensificação de bandas em 803 ( $\text{COO}^-$ ), 931 e 1150  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3$ ). A comparação foi realizada com o espectro do sólido e não com o espectro Raman de uma solução, porém ao se observar os espectros Raman do Triptofano em solução da literatura, pode-se observar que as bandas intensificadas permanecem as mesmas, ou seja, não há perda de informação na comparação com o espectro da espécie no estado sólido (Hernandez *et al.*, 2010). Neste trabalho propõe-se adsorção do D-Trp à superfície de prata pelos grupos amina e ácido. O comportamento é semelhante ao obtido para o L-Trp em outros trabalhos (Kim, Kim e Suh, 1987; Lee, Suh e Kim, 1988; Chuang e Chen, 2009; Kandakkathara, Utkin e Fedosejevs, 2011).

Figura 33 – Espectro SERS do D-Trp na presença de AgNPC.



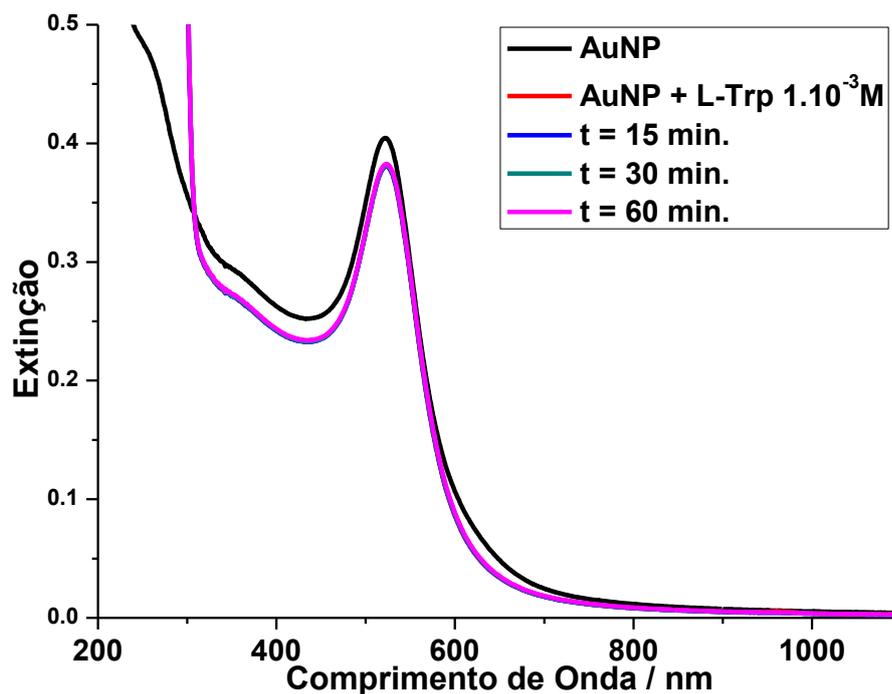
Legenda: Radiação excitante em 532 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.10.2. LSPR e SERS do Trp em AuNP

Os espectros LSPR de L-Trp também foram obtidos em presença de nanopartículas de ouro e são mostrados na Figura 34. Pode-se observar nos espectros que a presença do L-Trp não modifica consideravelmente o perfil espectral, enquanto no espectro do coloide o máximo se encontra em 522 nm, na presença do adsorbato ele desloca-se para 523 nm. Além disso, a adsorção ocorre rapidamente, vide que, o perfil espectral não sofre alterações ao longo do tempo, ocasionando a sobreposição dos espectros. Diferentemente do comportamento em prata, nesta mesma concentração, as moléculas não induziram a dimerização.

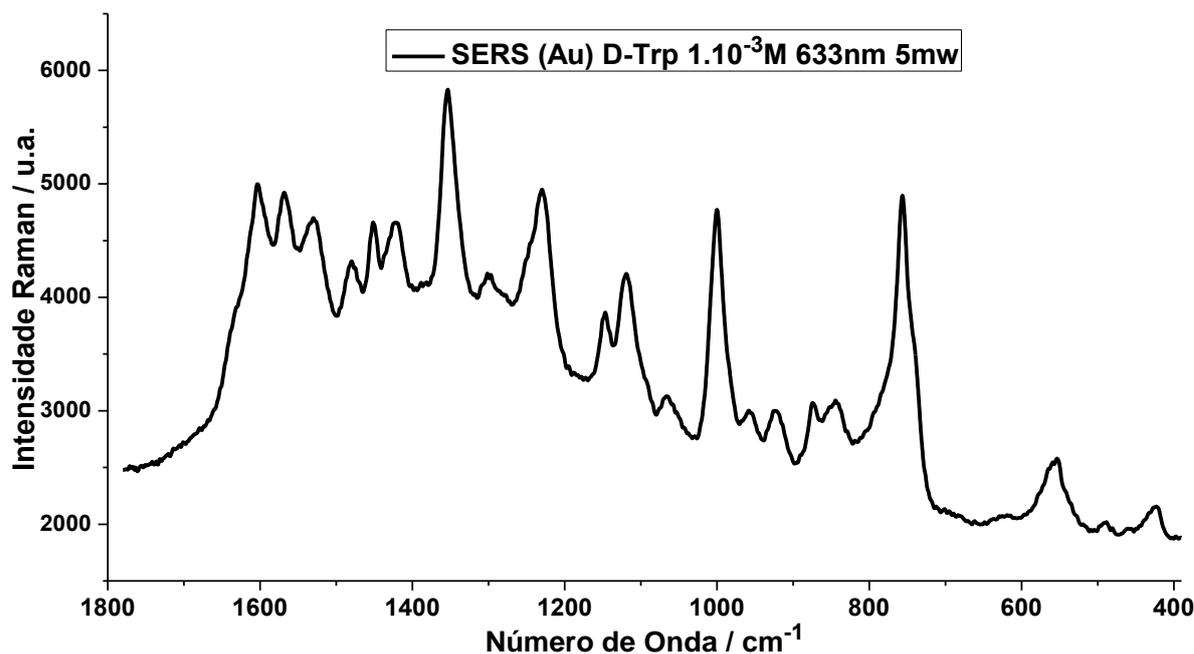
Figura 34 – Espectros LSPR do coloide AuNP na presença de L-Trp



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro SERS obtido em ouro (Figura 35) apresenta um perfil diferente daquele obtido em prata (Figura 33). Primeiramente, algumas bandas associadas ao anel estão deslocadas para menor número de onda, como 1000 e 1530  $\text{cm}^{-1}$ . Outro aspecto significativo se dá pela ausência das bandas atribuídas ao grupo ácido, os quais eram fracos no Raman e intensificados no SERS em prata. O mesmo não pode ser afirmado sobre a amina, a qual são atribuídos os modos intensificados em 923 e 1147  $\text{cm}^{-1}$ . Por último, neste espectro pode-se observar a presença de bandas em 423 e 554, as quais são atribuídos a modos fora do plano, sugerindo que o anel esteja inclinado à superfície (Moskovits, 1982). O deslocamento de bandas atribuídas ao anel, por exemplo, em 1000, 1530 e 1568, para menores número de onda sugere a adsorção da molécula através do nitrogênio do anel. Em virtude destas mudanças espectrais, sugere-se que a adsorção ocorra pelo nitrogênio do indol, de maneira mais intensa, e pela amina.

Figura 35 – Espectro SERS do D-Trp em presença de nanopartículas de ouro.

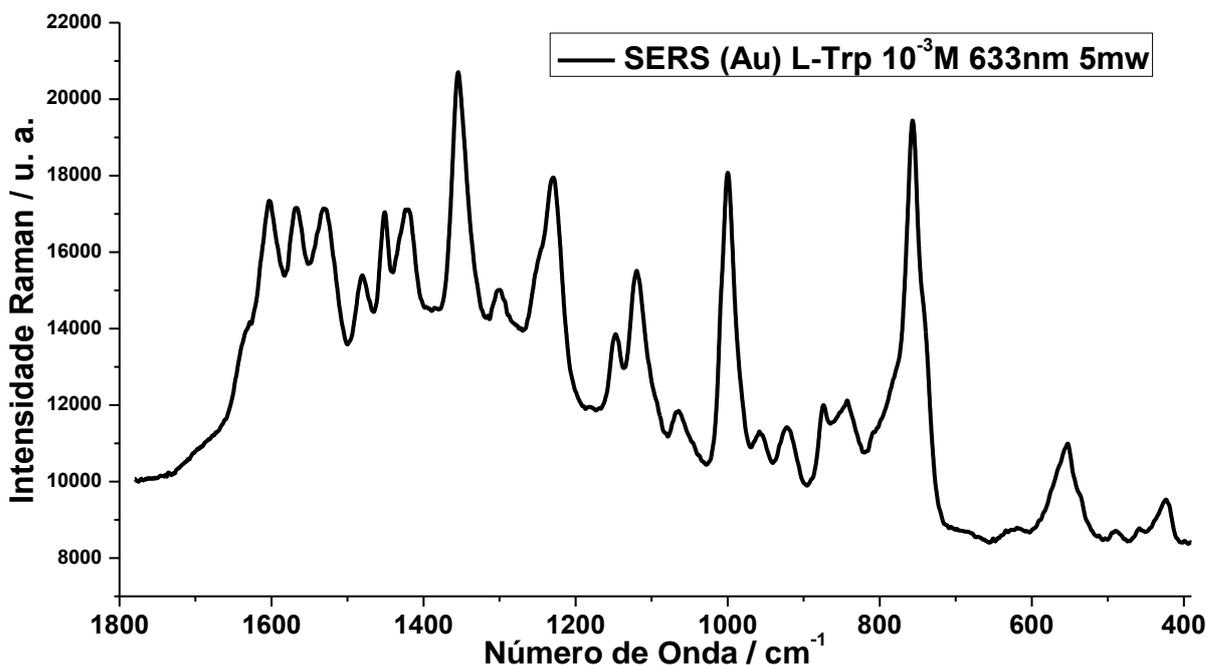


Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em ambos os metais, os espectros apresentaram bandas atribuídas a modos fora do plano, portanto torna-se difícil de dizer em qual deles a molécula encontra-se mais paralela ou perpendicular à superfície metálica.

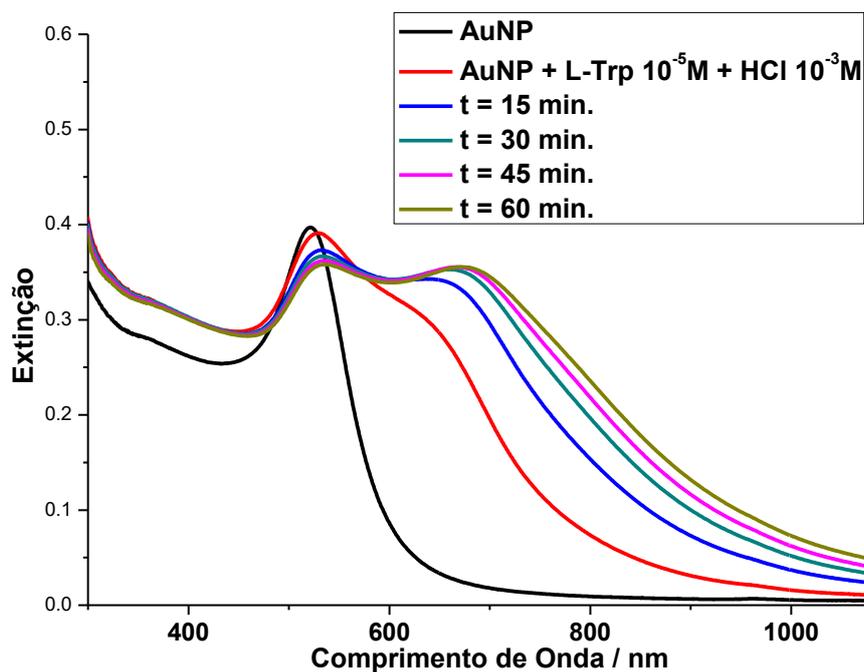
O espectro SERS do L-Trp (Figura 36) em ouro mostra-se muito semelhante ao obtido para o D-Trp (Figura 35), este comportamento já era esperado pelas informações obtidas através dos espectros Raman e LSPR.

Figura 36 – Espectro SERS do L-Trp  $10^{-3}$ M em presença de AuNP.

Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

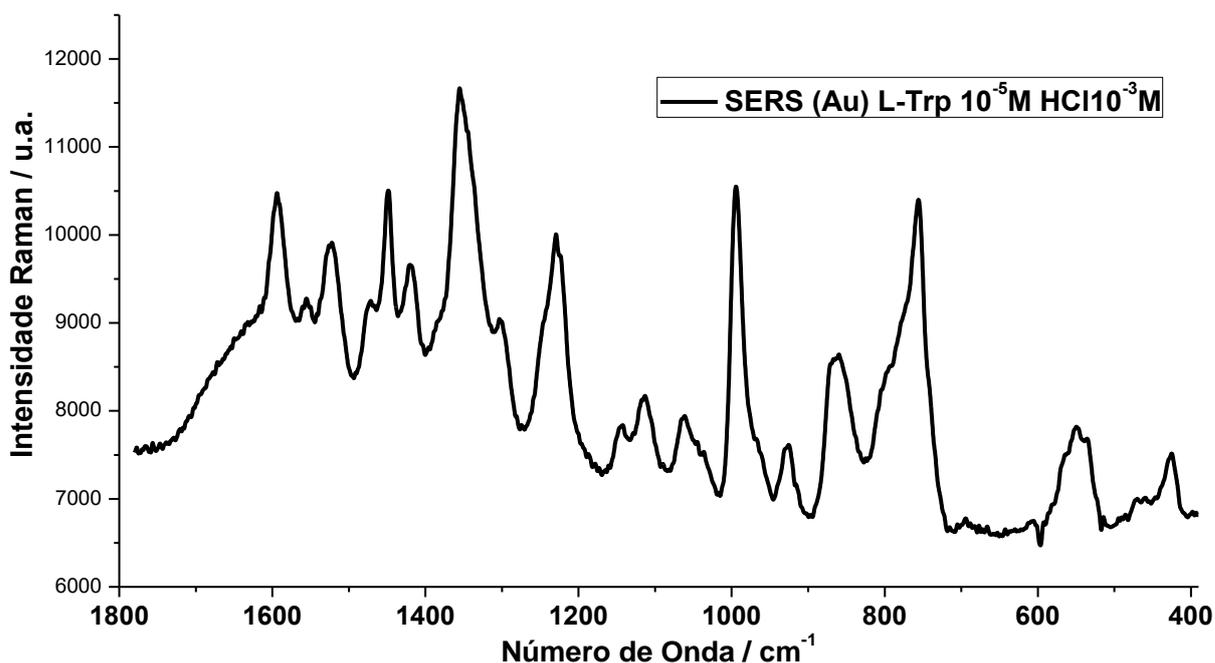
O último espectro LSPR envolvendo a molécula L-Trp (Figura 37) foi realizado na presença de nanopartículas de ouro e ácido clorídrico. A adição de ácido tem por objetivo deslocar o equilíbrio, aumentando a população de espécies com carga positiva e permitir a obtenção do espectro em concentrações menores. O espectro em vermelho foi obtido momentos após a mistura entre o adsorbato e a suspensão, nele pode se observar o alargamento da banda em 520 nm e o surgimento de um ombro em 630 nm que se estende até 1000 nm. O avanço do tempo revela que as maiores alterações ocorrem até os 30 minutos. Ao fim de uma hora, há o ligeiro deslocamento do máximo para 530 nm, sendo que em 674 nm há o surgimento de outra banda que se estende para o infravermelho próximo.

Figura 37 – Espectros LSPR de AuNP em presença de L-Trp  $10^{-5}$ M e HCl  $10^{-3}$ M.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A Figura 38 apresenta o espectro SERS do L-Trp em AuNPs na presença de HCl. A presença de HCl leva à mudança das intensidades relativas das bandas quando comparada aos espectros obtidos anteriormente. As bandas do anel novamente se mostram muito intensas no espectro, contudo, neste caso, há de se destacar o maior deslocamento para menor comprimento de onda (anteriormente em 1000, 1530, 1604  $\text{cm}^{-1}$ , agora 994, 1522 e 1594  $\text{cm}^{-1}$ ), sugerindo-nos um fortalecimento na interação entre a molécula e a nanopartícula através do anel indol.

Figura 38 – Espectro SERS em ouro do L-Trp  $10^{-5}$ M em presença de HCl  $10^{-3}$ M.

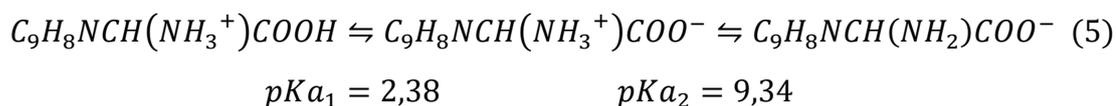


Legenda: Linha laser em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Enquanto o indol apresentou bandas mais deslocadas para menor energia, pôde-se observar a redução na intensidade das bandas atribuídas a amina, em 930 e 1142  $\text{cm}^{-1}$ .

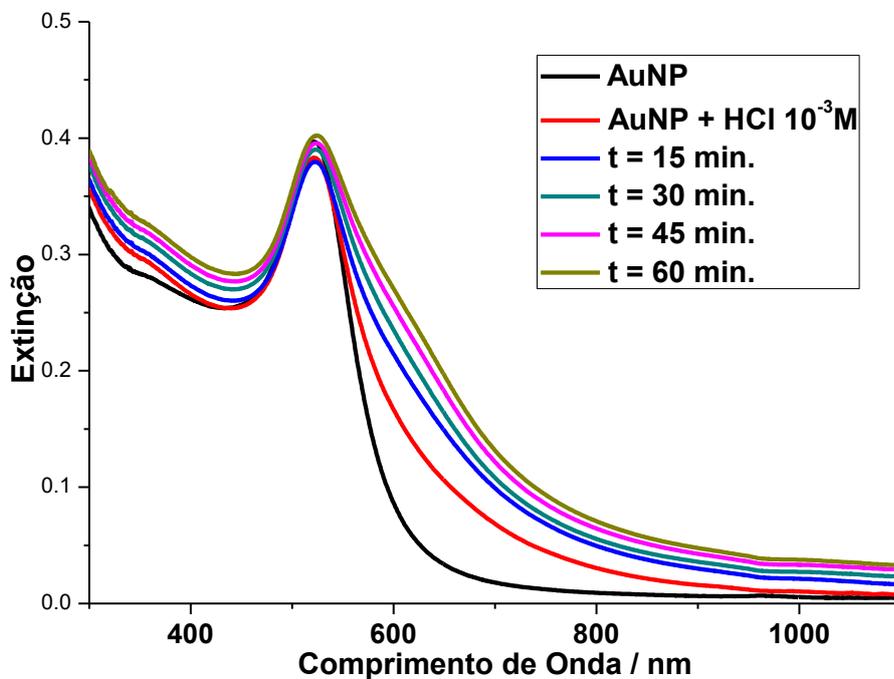
Há de se destacar a diferença observada entre o comportamento do sistema nanopartícula + L-Trp na ausência e presença de HCl. Enquanto na ausência a concentração 100 vezes maior não modifica o espectro significativamente, a presença de HCl permite que  $10^{-5}$ M mude o perfil espectral significativamente. A mudança de pH desloca o equilíbrio formado entre as espécies zwitteriônica, catiônica e aniônica, ou ainda, a adição de ácido aumenta a população da espécie catiônica. A equação 5 contém os equilíbrios existentes em solução e os respectivos  $\text{pK}_a$ 's.



As nanopartículas apresentam estabilizantes com carga negativa que impedem a agregação, neste caso é o citrato. Por conta da afinidade eletrostática com as moléculas de citrato, uma molécula carregada positivamente apresenta maior facilidade em aproximar-se da superfície metálica. Considerar que a presença de íons cloreto leva a agregação das nanopartículas, poderia ser outra possibilidade de explicação para a formação de uma nova

banda LSPR, contudo os espectros LSPR mostrados na figura 39 descrevem um comportamento diferente daquele observado na presença de L-Trp (Figura 37).

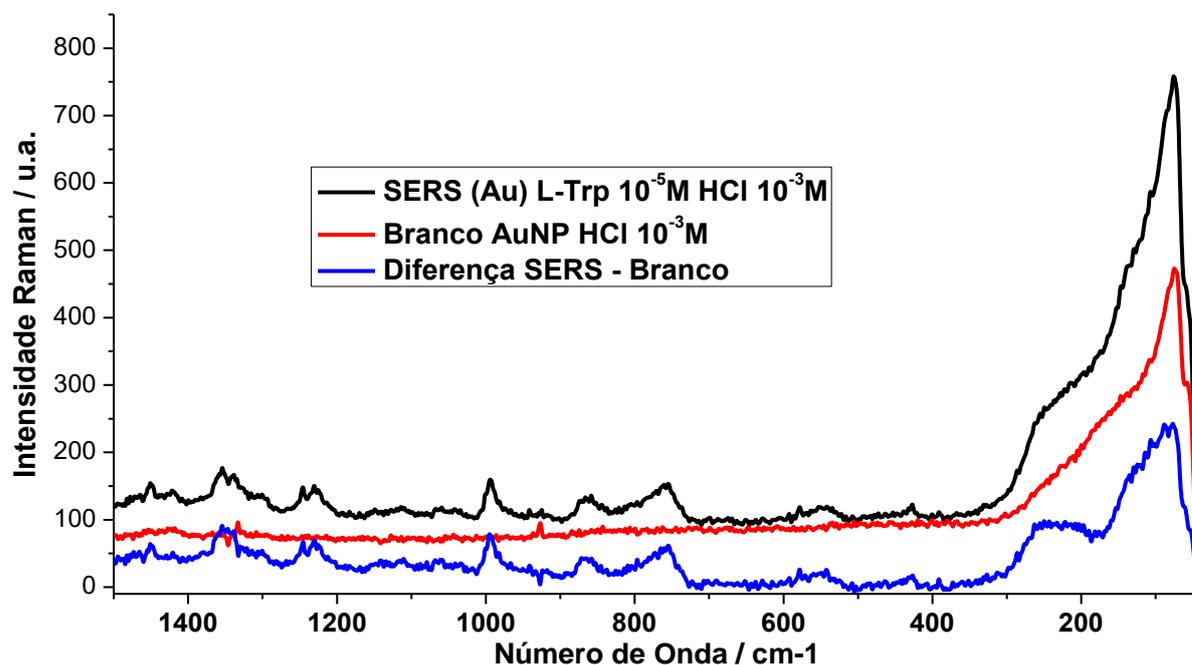
Figura 39 – Espectros LSPR do coloide AuNP em presença de HCl  $10^{-3}$  M.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Figura 39 pode-se observar que a presença do ácido levou ao alargamento da banda LSPR na região acima de 560 nm e uma cauda que se estende até 900 nm. A evolução em função do tempo mostra-se significativa nos primeiros 15 minutos, após este período a banda se alarga cada vez mais, contudo a diferença se torna cada vez menor. Ao final de 1 hora, a suspensão ainda possui o máximo em 522 nm, porém há de se observar que a banda se estende por toda a região do visível e, inclusive, ao infravermelho próximo. Pode-se afirmar que a presença de HCl leva a agregação das nanopartículas, porém de forma controlada, ou seja, sem que haja a perda de suas propriedades plasmônicas.

A Figura 40 mostra 3 espectros em uma região de menor energia com o objetivo de investigar a ligação Au-N. O primeiro é um espectro SERS em ouro do L-Trp na presença de HCl, o segundo é um espectro do coloide na presença de HCl  $10^{-3}$ M e o terceiro, um espectro resultante da subtração do espectro SERS pelo espectro do coloide e ácido.

Figura 40 – Espectros SERS em ouro do L-Trp  $10^{-5}$ M em presença de HCl  $10^{-3}$ M.

Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em ca. De  $250\text{ cm}^{-1}$  há o aparecimento de um ombro no espectro SERS, ao se realizar a subtração, torna-se nítido o surgimento de uma banda nessa região que pode ser atribuída a formação de uma ligação ouro-nitrogênio (Lopez-Tobar *et al.*, 2015). Em virtude do deslocamento das bandas do anel para menor número de onda, supõe-se que a ligação formada seja entre o nitrogênio do anel indólico e a nanosuperfície de ouro. Esta proposta diverge de muitas propostas de adsorção para o L-Trp tanto em prata quanto em ouro, contudo, o trabalho de Lopez-Tobar *et al.* (2015) investigando a adsorção da Somatostatina (peptídeo de 14 aminoácidos com L-Trp em sua estrutura) revela o mesmo comportamento observado para o L-Trp.

Na Tabela 3 encontra-se um resumo das atribuições realizadas para os espectros Raman, SERS em prata e ouro das moléculas de Triptofano.

Tabela 3 – Atribuição dos espectros SERS e Raman do D-Trp e do L-Trp.

Raman	Ag D-Trp $10^{-3}$ M	Au Trp $10^{-3}$ M	L-Trp Au $10^{-5}$ M HCl $10^{-3}$ M	Atribuição <sup>1, 2, 3 e4</sup>
425 w		423 w	425 w	$\phi(\text{CH})_r$
	460 w			$\nu(\text{CC})_{R,r}$
574 w	580 w	554 w	550 m	$\phi(\text{C})_{R,r}$ , $\phi(\text{CCC})_{R,r}$ , $\phi(\text{NH})_r$
597 w				$\phi(\text{NH})_r$

756 vs	758 vs	756 s	756 s	$\theta(R, r)$
804 w	803 w			$\nu(\text{C-COO}^-)$
875 s	874 m	874 w	860 m	$\delta(\text{CH})R, r$
923 w	931 m	923 w	926 w	$\delta(\text{NH}_3)$
1009 vs	1011 vs	1000 s	994 s	$\theta(R, r)$
1119 m	1126 m	1119 m	1113 w	$\nu(\text{CC})R, \delta(\text{CH})R, r$
1150 vw	1150 m	1147 m	1142 w	$\delta(\text{NH}_3)$
1233 m	1242 m	1230 m	1229 s	$\delta(\text{CH})R, r$
	1298 s	1301 w	1303 w	
1338 s	1341 s			$\nu(\text{NC})r, \nu(\text{CC})R$
1359 vs	1359 s	1354 s	1355 s	$\nu(\text{NC})r, \nu(\text{CC})R$
	1402 s			$\nu_{sim}(\text{COO}^-)$
1423 s	1419 sh	1423 w	1420 w	$\nu(\text{CC})r, R$
1458 m	1458 m	1452 w	1448 m	$\delta(\text{CH})R$
1486 m	1470 m	1480 w	1471 w	$\nu(\text{CC})R, \delta(\text{CH})r$
1557 s	1550 s	1530 m	1522 m	$\nu(\text{NC})r$
1577 m	1579 s	1568 m	1556 w	$\nu(\text{CC})R$
	1603 s	1604 m	1594 m	$\nu(\text{CC})R, r$
1617 w	1618 s			$\nu_{as}(\text{COO}^-)$

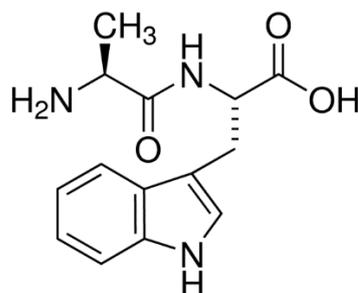
Legenda: Todos os valores estão em  $\text{cm}^{-1}$ . R: anel 6 membros; r: anel 5 membros; sim: simétrico; as: antissimétrico; vw: muito fraca; w: fraca; m: média; s: forte; vs: muito forte.  $\phi$ : deformação angular fora do plano;  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\nu$ : estiramento;  $\theta$ : respiração do anel. <sup>1,2,3 e 4</sup> referem-se aos trabalhos de Takeuchi e Harada (1986), Chuang e Chen (2009), Hernandez *et al.* (2010) e Hussain e Pang. (2015)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.11. ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA Ala-Trp

Nesta seção serão discutidos espectros LSPR, Raman e SERS envolvendo o dipeptídeo Ala-Trp. Vale lembrar que o dipeptídeo apresenta o triptofano como carboxi-terminal e a alanina como amino-terminal, como ilustrado pela Figura 41.

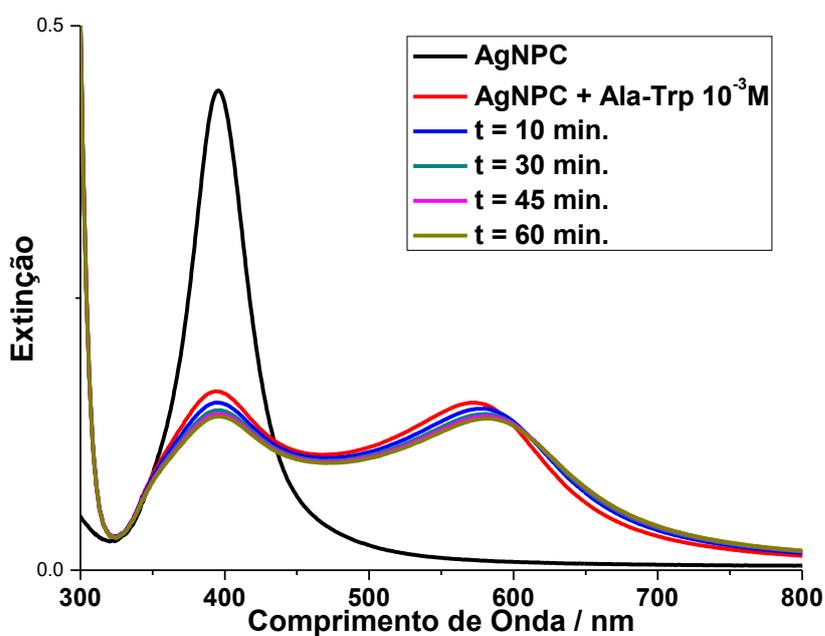
Figura 41 – Representação da molécula Ala-Trp.



Fonte: Sigma-Aldrich.

O espectro LSPR das nanopartículas de prata em presença de Ala-Trp  $10^{-3}\text{M}$  está apresentado na Figura 42. O comportamento é similar ao apresentado pelo Trp, ou seja, redução significativa da intensidade banda em 390 nm nos primeiros minutos após a mistura da suspensão com a solução da molécula, seguido pelo alargamento e surgimento de uma nova banda em maior comprimento de onda. O primeiro espectro após a adição do dipeptídeo mostra o surgimento de uma nova banda com máximo em 570 nm, com o passar do tempo, o máximo desloca-se para o vermelho, até que ao final de uma hora ele se encontra em 581 nm. Enquanto no Trp, o máximo da nova banda surgia em, aproximadamente, 530 nm, a presença de Ala-Trp levou à agregação e formação de estruturas maiores que a anterior. Em consequência desta aglomeração, é de se esperar a intensificação do espectro Raman para as radiações tanto em 532 nm, como em 633 nm.

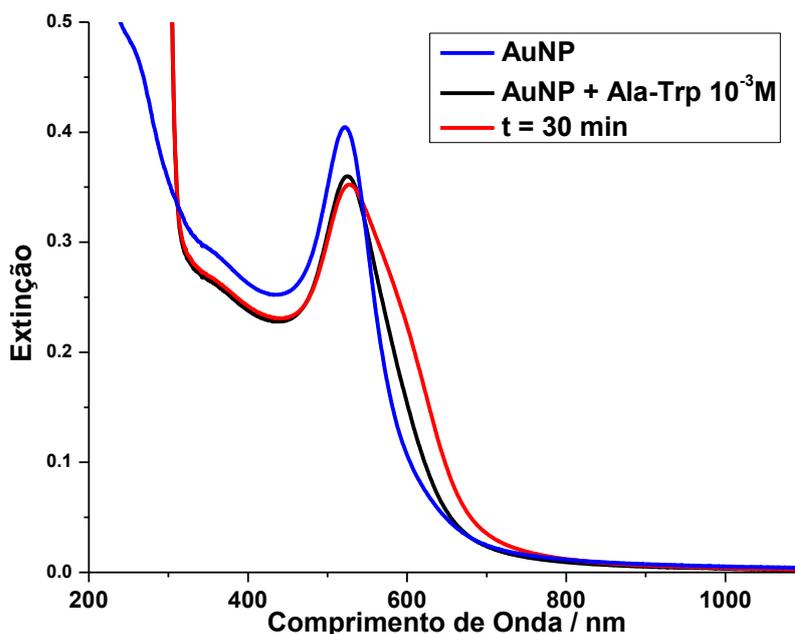
Figura 42 – Espectros LSPR de AgNPC em presença de Ala-Trp  $10^{-3}\text{M}$ .



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Estudo espectroscópico semelhante foi conduzido em ouro (Figura 43). O espectro LSPR das AuNPs encontrava-se em 520 nm, contudo, na presença de Ala-Trp o máximo se deslocou ligeiramente para o vermelho já nos primeiros minutos, porém as mudanças significativas vêm tanto da diminuição da intensidade, quanto do alargamento da banda para a região acima de 560 nm. O espectro, 30 minutos após a mistura, mostra que o máximo da banda pouco se deslocou, no entanto vem acompanhado de uma mudança mais significativa na largura da banda. Em comparação ao L-Trp, o dipeptídeo favorece mais a agregação que o aminoácido isolado, comportamento verificado em ambos os coloides metálicos.

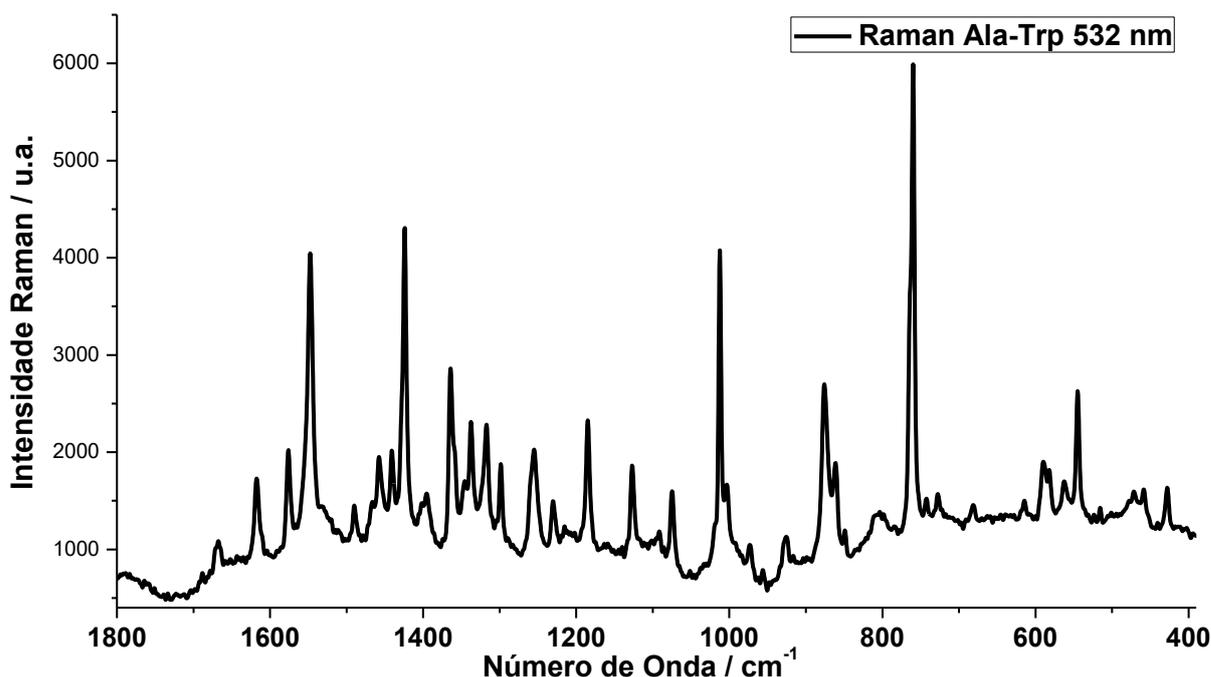
Figura 43 – Espectros LSPR de AuNP em presença de Ala-Trp  $10^{-3}$ M.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O espectro Raman da Ala-Trp em estado sólido excitado em 532 nm pode ser visto na Figura 44. As bandas mais intensas do espectro estão em 760, 876, 1012, 1364, 1547  $\text{cm}^{-1}$ . Observar apenas as principais bandas do espectro já revela que o espectro do dipeptídeo apresenta, principalmente, bandas observadas no L-Trp. Em uma análise mais cuidadosa, pode-se verificar que esse comportamento se estende às bandas menos intensas também. Podem ser atribuídas ao grupo ácido as bandas em 804  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C-COO}^-)$ , e 1618  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{COO}^-)$ . Neste dipeptídeo, o grupo amina disponível para coordenação encontra-se na alanina, por isso, baseado no estudo SERS da L-Alanina supõe-se que a banda em 1091  $\text{cm}^{-1}$  seja  $\delta(\text{NH}_3^+)$  (Suh e Moskovits, 1986).

Figura 44 – Espectro Raman da Ala-Trp em estado sólido.



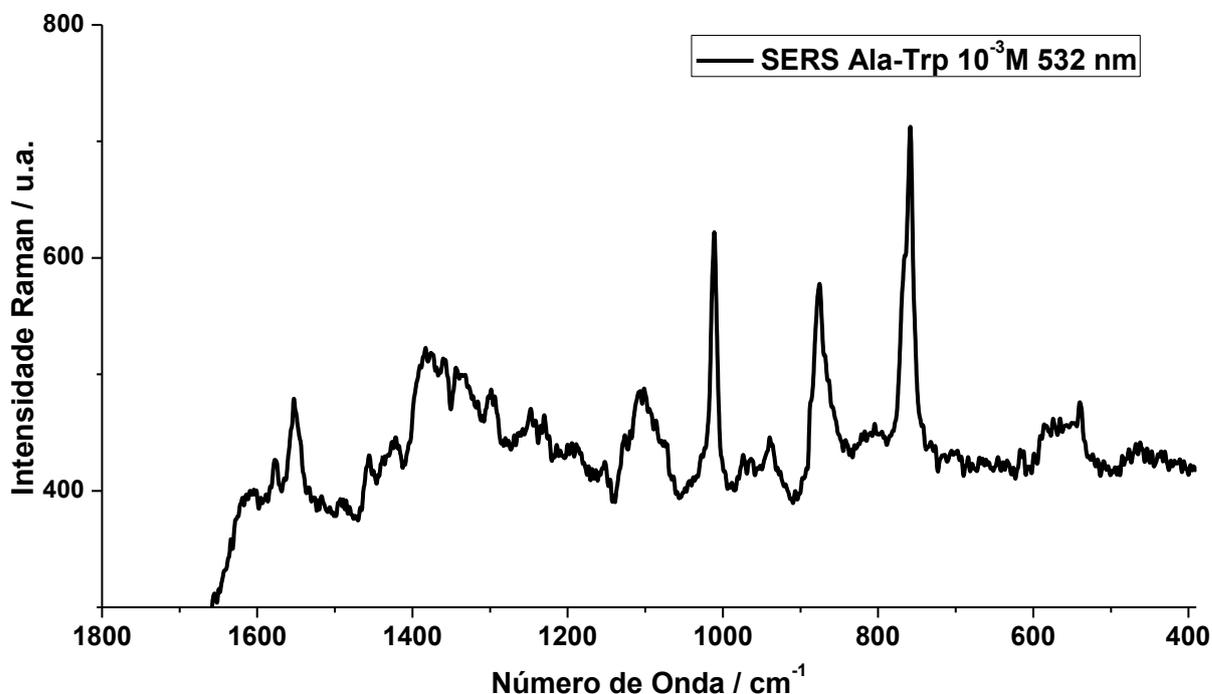
Legenda: Radiação excitante em 532 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na figura 45 está representado o espectro SERS do dipeptídeo Ala-Trp na concentração de  $10^{-3}$  M sob radiação excitante de 532 nm. As bandas mais intensas do anel, 759, 1011, encontram-se próximas ao obtido no espectro do sólido, indicando que a adsorção não ocorreu pelo nitrogênio do indol. A região de menor número de onda, entre  $480$  e  $580\text{ cm}^{-1}$ , apresenta uma banda larga que pode estar relacionada a diversas bandas fracas presentes no espectro Raman. A presença destas bandas, associada às bandas de respiração do anel, permitem dizer que o anel se encontra inclinado em relação ao plano da superfície da nanopartícula. A região espectral entre  $1050$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  apresenta diversas bandas que não se encontram bem resolvidas, ainda assim, algumas observações são pertinentes. A banda mais intensa nesta região está em ca.  $1383\text{ cm}^{-1}$ , ela pode estar relacionada ao grupo ácido,  $\nu(\text{COO}^-)$ , pois possui o mesmo comportamento apresentado no espectro SERS do L-Trp, banda equivalente fraca no Raman e intensa apenas em prata (observar Tabela 4 com a atribuição dos espectros). Outro ponto pertinente desta região é a intensificação de uma banda em  $1102\text{ cm}^{-1}$ , possivelmente atribuída a amina,  $\nu(\text{NC})$ , pela comparação com dados da literatura referentes a L-alanina. (Suh e Moskovits, 1986) A região de maior energia apresenta um ombro em torno de  $1620\text{ cm}^{-1}$ , o qual é atribuído ao  $\nu(\text{COO}^-)$ , e também pode ser um indício do sítio molecular de adsorção. Associando o conjunto de informações apresentado acima, pode-se afirmar que o anel indol

está inclinado em relação à nanosuperfície e que o dipeptídeo não se adsorve pelo nitrogênio, mas provavelmente pelos grupos amina da alanina e ácido do triptofano.

Figura 45 – Espectro SERS da Ala-Trp  $10^{-3}$ M em prata.



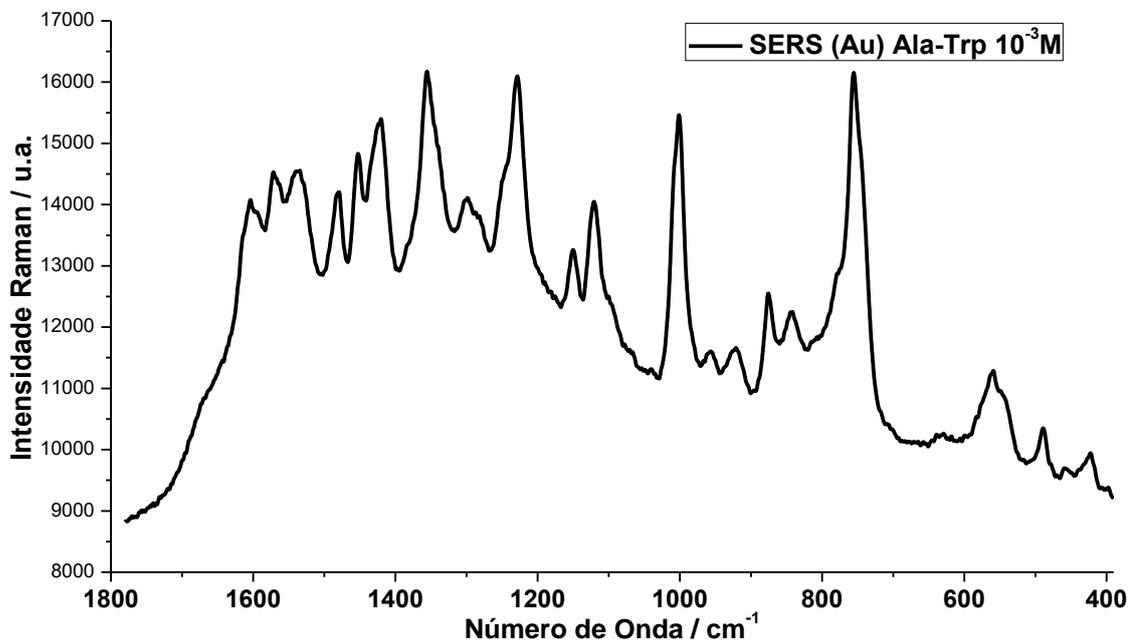
Legenda: Radiação excitante em 532 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro SERS da Ala-Trp em ouro (Figura 46) apresenta bandas intensas em 756, 1000, 1229, 1356, 1421, 1453, 1535, 1572 e 1604  $\text{cm}^{-1}$ , que são atribuídas ao anel indólico. Outra característica interessante deste espectro, consiste no deslocamento de bandas comparadas ao sólido (Figura 44), 756 (760 no sólido), 1000 (1012), 1229 (1230), 1356 (1364), 1421 (1424), 1453 (1458), 1535 (1547) e 1572 (1576)  $\text{cm}^{-1}$  (Tabela 4). Dentre as bandas acima, 1229, 1356, 1453 e 1572  $\text{cm}^{-1}$  destacam-se pela intensificação quando comparadas ao espectro Raman, tal comportamento pode ser consequência da coordenação na nanopartícula. Para as outras duas, a melhor explicação seria que a intensificação ocorre em razão da geometria de adsorção, vide que as mesmas bandas estão presentes no espectro SERS do Trp em ouro, porém menos intensas. Em outras palavras, é possível que a mudança na intensidade relativa de algumas bandas ocorre pela mudança na geometria de adsorção causada pela presença da Ala (Moskovits, 1982). Ainda comparando-se os espectros SERS do Trp e da Ala-Trp em ouro, pode-se perceber que o perfil espectral é muito semelhante, ou seja, a interação formada entre o indol e a superfície de ouro é tão significativa, a ponto de não haver grandes alterações na adsorção. Por fim, a observação de modos em baixo número de onda, atribuídos a modos fora

do plano, também se mantém e por isso pode-se dizer que o anel encontra-se inclinado à superfície.

Figura 46 – Espectro SERS da Ala-Trp  $10^{-3}$ M em ouro.



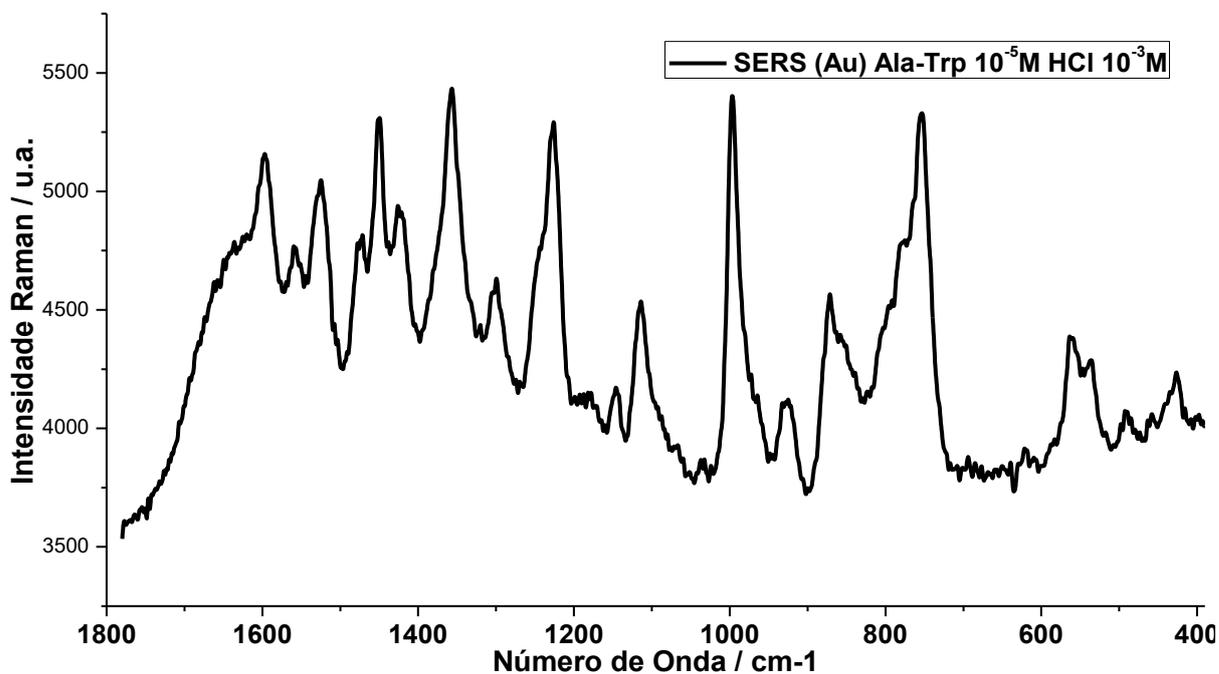
Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Assim como para o L-Trp, foi obtido um espectro SERS do dipeptídeo em concentração mais baixa ( $10^{-5}$ M) na presença de ácido clorídrico (Figura 47). As bandas mais intensas do espectro são  $753, 997, 1226, 1357, 1450, 1525$  e  $1597 \text{ cm}^{-1}$ , todas elas são atribuídas ao anel indólico. A seguir, será adotada a seguinte notação, entre parênteses estará o valor da banda no espectro Raman, seguido pelo valor no espectro SERS na ausência de HCl. O deslocamento das bandas referentes ao anel,  $753 (760, 756), 997 (1012, 1000), 1114 (1127, 1121), 1226 (1230, 1229), 1450 (1458, 1453), 1525 (1547, 1535)$  e  $1560 (1576, 1572) \text{ cm}^{-1}$ , em conjunto com a intensificação destas bandas, permite-nos inferir que a interação entre a molécula e a nanopartícula ocorre através do nitrogênio do anel indólico. Tal hipótese torna-se ainda mais provável ao se comparar com o estudo do L-Trp realizado anteriormente, onde foram observados o mesmo comportamento e o surgimento de uma banda em cerca de  $250 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída à ligação Au-N. De forma análoga ao espectro SERS da Ala-Trp em ouro, a intensificação de algumas bandas, comparadas ao perfil Raman do sólido, ocorre pela simples adsorção à superfície metálica, enquanto outras pela mudança de geometria em razão da presença de Ala. Continuando as comparações, o perfil espectral da Ala-Trp se assemelha mais ao obtido pelo L-Trp nas mesmas condições, do que aquele observado para a Ala-Trp em  $10^{-5}$

<sup>3</sup>M. Por último, a presença de bandas fora do plano na região entre 400 e 600  $\text{cm}^{-1}$  indica que o anel encontra-se inclinado em relação ao plano da superfície metálica.

Figura 47 – Espectro SERS em ouro da Ala-Trp  $10^{-5}\text{M}$  na presença de HCl  $10^{-3}\text{M}$ .



Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Tabela 4 pode ser verificada as mudanças provocadas pelos diferentes ambientes químicos.

Tabela 4 – Atribuição dos espectros Raman e SERS da Ala-Trp.

Raman	Ag	Au $10^{-3}\text{M}$	Au $10^{-5}\text{M}$	Atribuição <sup>1, 2, 3 e 4</sup>
428 w		423 w	427 w	$\phi(\text{CH})_r$
458 w		460 vw	458 vw	$\nu(\text{CC})_{R,r}$
574 w				$\phi(\text{C})_{R,r}$ , $\phi(\text{CCC})_R$ , $\phi(\text{NH})_r$
760 vs	759 vs	756 s	753 s	$\theta(R, r)$
803 w	804 w			$\nu(\text{CCOO}^-)$
861m			858 sh	$\nu(\text{C-CH}_3)_{\text{Ala}}$
876 m	875 s	876 m	871 m	$\delta(\text{CH})_{R,r}$
1012 s	1011 s	1000 s	997 s	$\theta(R, r)$
1091 vw	1102 m			$\nu(\text{CN})_{\text{Ala}}$

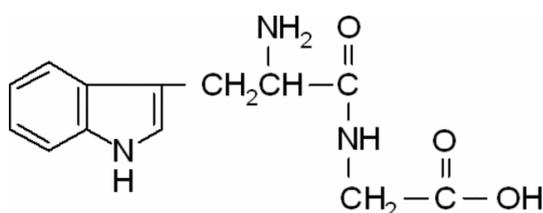
1127 m	1126 sh	1121 m	1114 m	$\nu(\text{CC})\text{R}, \delta(\text{CH})\text{R},\text{r}$
	1152 vw	1150 w	1146 w	$\delta(\text{NH}_3)$
1230 w	1230 w	1229 s	1226 s	$\delta(\text{CH})\text{R},\text{r}$
1298 w	1299 m	1299 w	1299 w	
1337 m		1337 sh		$\nu(\text{NC})\text{r}, \nu(\text{CC})\text{R}$
1346 sh	1344 m			
1364 m	1360	1356 s	1357 s	$\nu(\text{NC})\text{r}, \nu(\text{CC})\text{R}$
1395 w	1383 m			$\nu(\text{COO}^-)$
1424 s	1422 w	1421 s	1426 m	$\nu(\text{CC})\text{r}, \text{R}$
1458 w	1456w	1453 s	1450 s	$\delta(\text{CH})\text{R}$
1490 w	1489 vw	1479 m	1471 m	$\nu(\text{CC})\text{R}, \delta(\text{CH})\text{r}$
1547 s	1553 m	1535 s	1525 s	$\nu(\text{NC})\text{r}$
1576 w	1577 w	1572 s	1560 m	$\nu(\text{CC})\text{R}$
	1605 vw	1597 s	1597 s	$\nu(\text{CC})\text{R}, \text{r}$
1618 w	1619 sh	1616 sh		$\nu(\text{COO}^-)$

Legenda: Todos os valores estão em  $\text{cm}^{-1}$ . vw: muito fraca; w: fraca; m: média; s: forte; vs: muito forte.  $\phi$ : deformação angular fora do plano;  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\nu$ : estiramento;  $\theta$ : respiração do anel. <sup>1,2,3 e 4</sup> referem-se aos trabalhos Takeuchi e Harada (1986), Chuang e Chen (2009), Hernandez *et al.* (2010) e Hussain e Pang. (2015) Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.12. ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO Trp-Gly

Nesta seção serão discutidos espectros LSPR, Raman e SERS envolvendo o dipeptídeo Trp-Gly. Vale lembrar que o dipeptídeo apresenta o triptofano como grupo amino terminal e a glicina como carboxi-terminal, como ilustrado pela Figura 48.

Figura 48 – Representação do dipeptídeo Trp-Gly

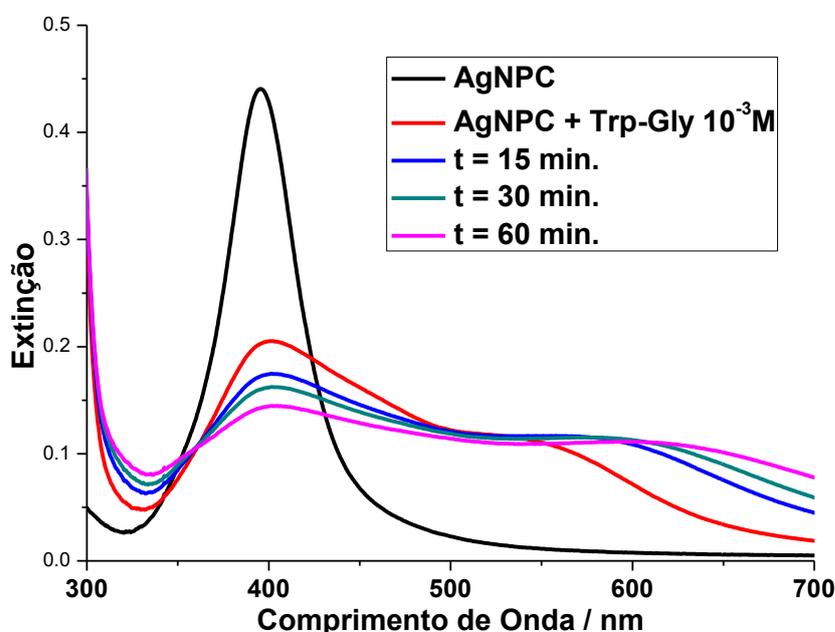


Fonte: Sigma-Aldrich.

Há de se destacar que o reagente adquirido é um sal, neutralizado com HCl, por isso, o comportamento pode diferir mais acentuadamente do comportamento do L-Trp.

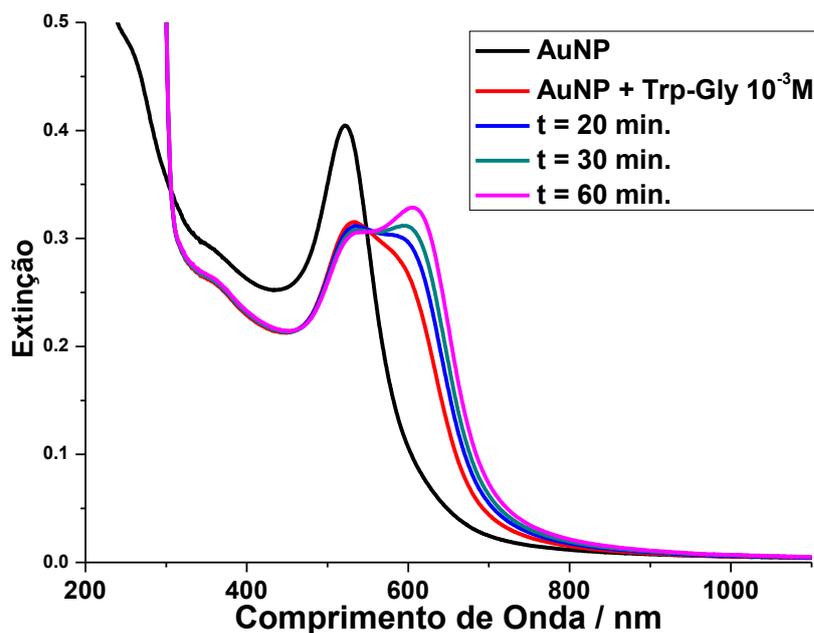
O espectro LSPR das nanopartículas de prata em presença do dipeptídeo é mostrado na Figura 49. Originalmente, o coloide apresentava uma banda centrada em 396 nm, porém na presença do Trp-Gly, esta banda diminui consideravelmente de intensidade, há o alargamento e um ombro surge em 540 nm. O espectro modifica-se com o passar do tempo, contudo a maior mudança ocorre nos primeiros instantes após a mistura. Ao final de uma hora, o máximo em 396 nm desloca-se para 401 nm, a banda se estende por toda a região do visível e o ombro se desloca para maior comprimento de onda (ca. 596 nm). Se na presença do aminoácido Trp formam-se dímeros, neste caso, as nanopartículas formam aglomerados maiores e de maior distribuição de tamanhos. Tal diferença no perfil espectral pode estar relacionada à presença de íons cloreto na composição do dipeptídeo.

Figura 49 – Espectros LSPR do AgNPC em presença de Trp-Gly  $10^{-3}$ M.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

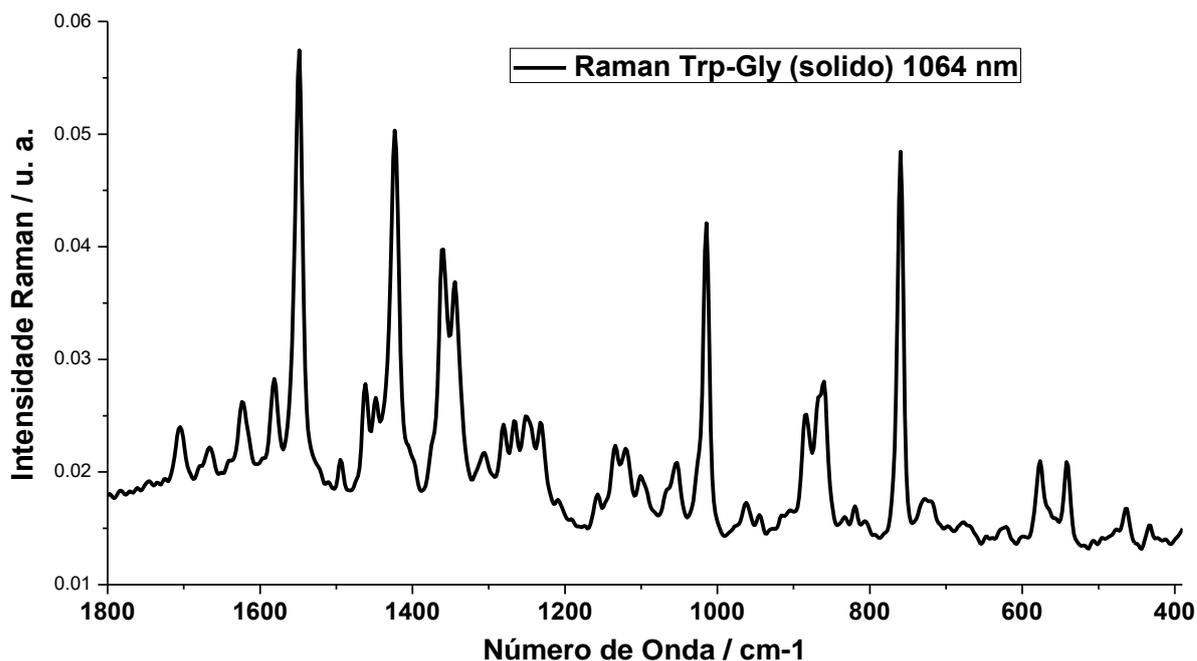
O espectro LSPR das nanopartículas de ouro em presença de Trp-Gly na concentração de  $10^{-3}$ M está apresentado na Figura 50. Momentos após a adição do dipeptídeo, o espectro já apresenta mudanças, como o deslocamento do máximo da banda de 522 para 533 nm e o surgimento de um ombro em 590 nm. Com o avançar do tempo, há o aumento de intensidade da banda com máximo em 605 nm, além de uma redução pequena na banda em 590 nm. Tal espectro, leva-nos a crer na maior presença de aglomerados de partículas que partículas individuais. Assim como em prata, o cloreto leva a formação de estruturas maiores, vide que a Trp-Gly leva a um comportamento diferente das nanopartículas daquele observado na presença de Ala-Trp.

Figura 50 – Espectros LSPR de nanopartículas de ouro em presença de Trp-Gly  $10^{-3}$ M.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A Figura 51 mostra o espectro Raman do Trp-Gly em estado sólido, excitado em 1064 nm. A maioria das bandas podem ser atribuídas ao triptofano, sendo que as mais intensas do espectro, 760, 1014, 1344, 1360, 1423 e 1549  $\text{cm}^{-1}$ , são atribuídas a modos envolvendo átomos do anel indólico. Entre as bandas menos intensas há de se destacar aquelas relacionadas aos grupos funcionais amina (1150  $\text{cm}^{-1}$ ) do Trp e ácido (806 e 1389  $\text{cm}^{-1}$ ) da Gly (Suh e Moskovits, 1986).

Figura 51 –Espectro Raman do dipeptídeo Trp-Gly em estado sólido.

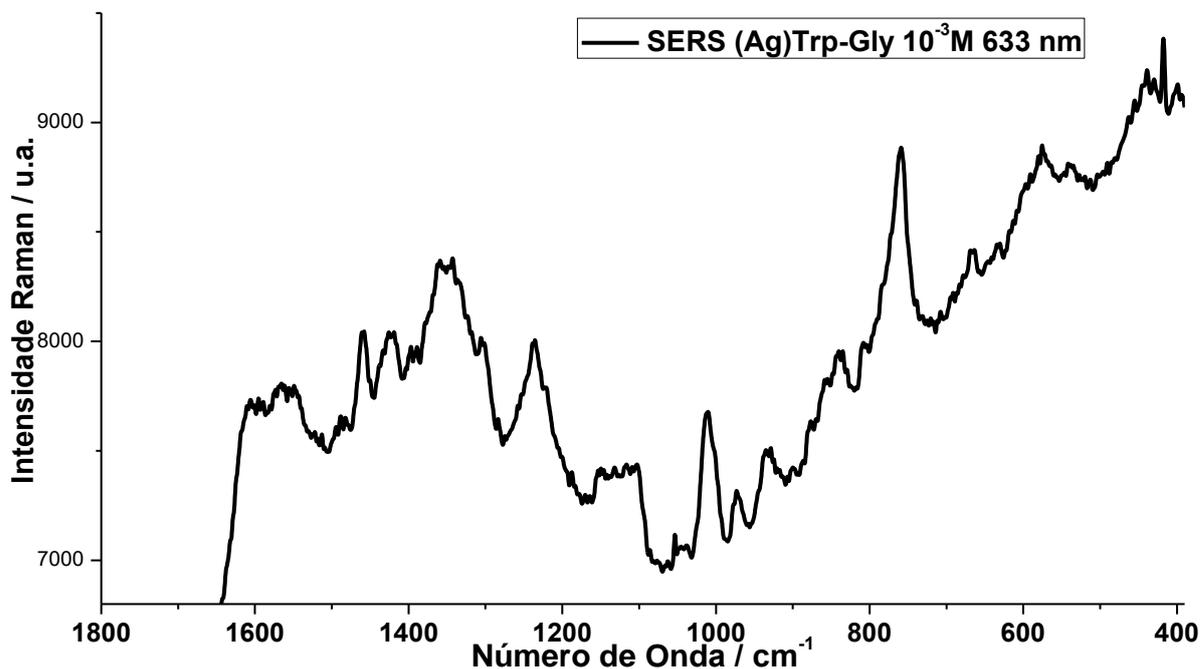


Legenda: Radiação excitante em 1064 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro SERS do Trp-Gly em presença de nanopartículas de prata é mostrado na figura 52. Este espectro SERS apresenta bandas intensas semelhantes às obtidas no Raman, como no SERS do L-Trp, entretanto, a região espectral entre 1500 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  apresenta bandas pouco intensas, comportamento diferente do observado anteriormente. As bandas mais intensas do anel (759 e 1010  $\text{cm}^{-1}$ ) se encontram pouco deslocadas para o vermelho, indicando que a molécula não adsorve pelo nitrogênio deste grupo. A banda em 929, ainda que fraca, torna-se representativa por não possuir equivalente no espectro do sólido, e além disso, pode ser atribuída ao grupo amina, ou seja, indicar um possível sítio de adsorção. Na região entre 1100-1150 há uma banda larga, que, na verdade, representa um conjunto de bandas fracas, uma delas, 1150  $\text{cm}^{-1}$ , pode ser atribuída a amina. Podem ser atribuídas ao grupo ácido, as bandas em 808, 1389 e 1607  $\text{cm}^{-1}$ , sendo que as duas primeiras não apresentam equivalentes no espectro do sólido. Em virtude da intensificação de bandas associadas ao grupo ácido e à amina, sugere-se que a molécula adsorva por estes grupos à superfície de prata, tal comportamento é semelhante ao observado para o L-Trp, como também, na literatura (Suh e Moskovits, 1986; Chuang e Chen, 2009).

Figura 52 – Espectro SERS de Trp-Gly  $10^{-3}$ M em prata.

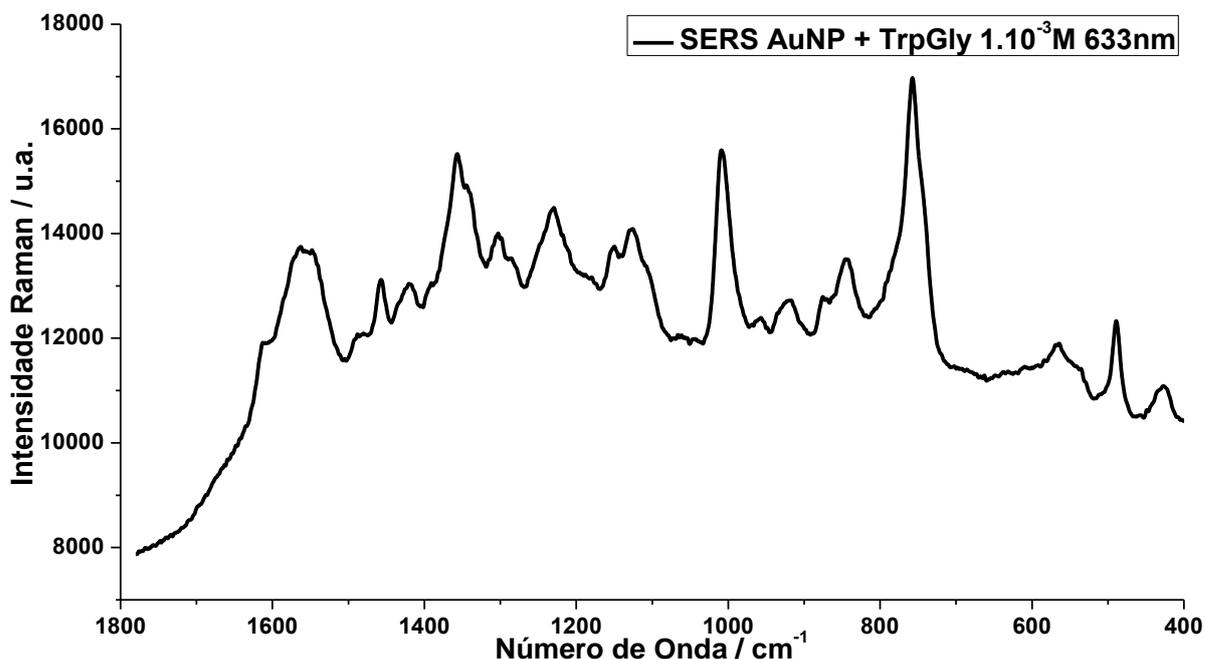


Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Figura 53 é apresentado o espectro SERS do Trp-Gly em ouro, sob radiação excitante de 633 nm. As bandas mais intensas do espectro, 757 1009 e 1357  $\text{cm}^{-1}$ , são atribuídas ao anel indólico. Em prata foi possível observar uma diminuição na intensidade relativa dos modos entre 1500 e 1600  $\text{cm}^{-1}$ , tal comportamento permanece neste espectro em ouro, a única diferença ocorre pela presença de um ombro em 1613  $\text{cm}^{-1}$ . O deslocamento das bandas do anel para o vermelho é um comportamento característico da adsorção pelo nitrogênio, no entanto, neste espectro as bandas não se deslocaram significativamente, o que pode ser uma indicação de uma interação mais fraca quando comparada aos espectros anteriores. A presença de bandas na região de menor número de onda, 427 e 565  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a modos fora do plano, é um indicativo que o anel encontra-se inclinado em relação à nanosuperfície (Moskovits, 1982).

Figura 53 – Espectro SERS de Trp-Gly  $10^{-3}$ M em ouro.

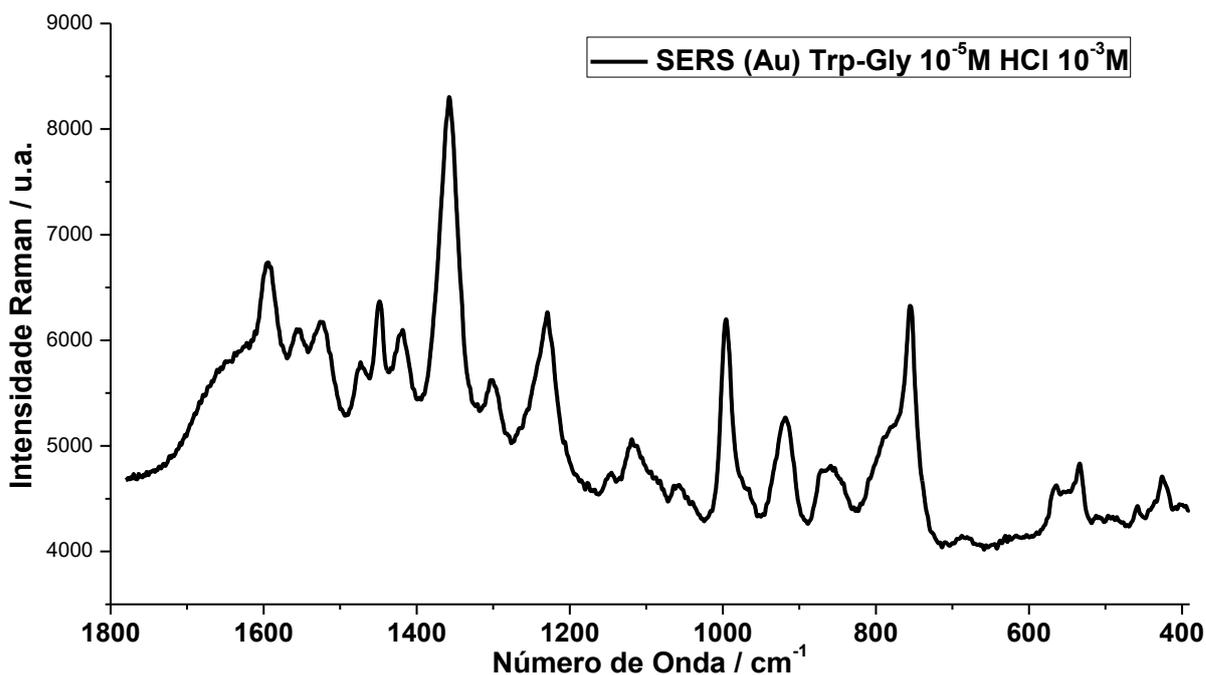


Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro SERS do Trp-Gly em presença de ácido clorídrico (Figura 54) mostra-se semelhante aos demais espectros obtidos anteriormente em presença de HCl. Contudo há de se destacar que a intensidade da banda em  $1355\text{ cm}^{-1}$ , relacionada a um dubleto, mostra-se muito mais intensa que as demais e em nenhum outro espectro tamanha diferença foi observada. As bandas mais intensas do espectro são  $756$ ,  $994$ ,  $1229$ ,  $1355$ ,  $1448$  e  $1594\text{ cm}^{-1}$ , todas elas atribuídas ao anel. Diferentemente do espectro SERS do Trp-Gly  $10^{-3}$ M, neste, as bandas voltam a deslocar-se significativamente para maior energia, os maiores exemplos disso são:  $994$  ( $1014\text{ cm}^{-1}$  no espectro Raman),  $1448$  ( $1462$ ) e  $1522$  ( $1549$ )  $\text{cm}^{-1}$ . A única semelhança observada com o espectro anterior está na presença das bandas atribuídas aos modos fora do plano ( $425$  e  $550\text{ cm}^{-1}$ ), os quais indicam que o anel encontra-se inclinado em relação à superfície (Moskovits, 1982).

Figura 54 – Espectro SERS em ouro do Trp-Gly  $10^{-5}$ M na presença de HCl  $10^{-3}$ M.



Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na tabela 5, uma tentativa de atribuição dos espectros do Trp-Gly, obtidos neste trabalho, é feita. Sendo possível inferir que em prata há a preferência pelos grupos amina e ácido, enquanto que em ouro pelo anel indol. Sob a concentração de  $10^{-3}$  M, o Trp-Gly apresenta um deslocamento bem menor das bandas, indicando uma interação mais fraca com a superfície, enquanto em  $10^{-5}$ M pode-se observar maior deslocamento e semelhança com os espectros de outras moléculas obtidos anteriormente.

Tabela 5 – Proposta de atribuição dos espectros Raman e SERS do Trp-Gly.

Raman	Ag	Au $10^{-3}$	Au $10^{-5}$	Atribuição <sup>1, 2, 3 e 4</sup>
		427 w	425 w	$\pi(\text{CH})_r$
464 w				$\nu(\text{CC})_{R,r}$
577 m	575 w	565 w	550 m	$\pi(\text{C})_{R,r}$ , $\gamma(\text{CCC})_R$ , $\pi(\text{NH})_r$
760 s	759 vs	757 s	756 s	$\theta(R, r)$
806 vw	808 vw			$\nu(\text{CCOO})$
	875 sh	875 sh	860-867 m	$\delta(\text{CH})_{R,r}$
	929 w		926 w	$\delta(\text{NH}_3)$
1014 s	1010 s	1009 s	994 s	$\theta(R, r)$

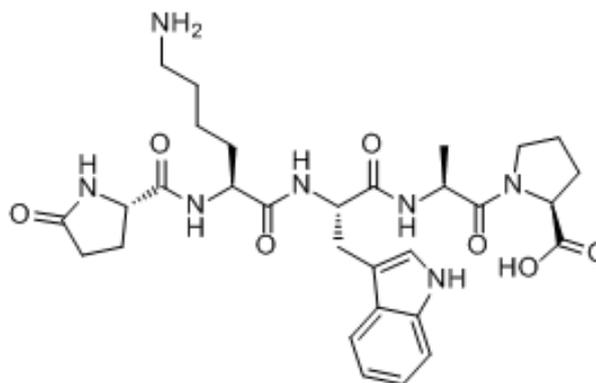
1120 m			1113 w	$\nu(\text{CC})\text{R}, \delta(\text{CH})\text{R}, \text{r}$
1133 m		1126 m		
1157 w		1150 w	1142 w	$\delta(\text{NH}_3)$
1232 m	1236 m	1230 m	1229 s	$\delta(\text{CH})\text{R}, \text{r}$
1344 s	1343 m	1345 sh		$\nu(\text{NC})\text{r}, \nu(\text{CC})\text{R}$
1360 s	1362 m	1357 s	1355 s	$\nu(\text{NC})\text{r}, \nu(\text{CC})\text{R}$
	1397 vw			$\nu(\text{COO}^-)$
1423 s	1426 e1419 m	1420 w	1420 w	$\nu(\text{CC})\text{r}, \text{R}$
1462 m	1461 m	1457 w	1448 s	$\delta(\text{CH})\text{R}$
1549 s	1549 w	1548 w	1522 m	$\nu(\text{NC})\text{r}$
	1566 w	1563 w	1556 w	$\nu(\text{CC})\text{R}$
1581 m				
	1595 vw		1594 s	$\nu(\text{CC})\text{R}, \text{r}$
1624 m				$\nu(\text{COO}^-)$

Legenda: Todos os valores estão em  $\text{cm}^{-1}$ . vw: muito fraca; w: fraca; m: média; s: forte; vs: muito forte.  $\phi$ : deformação angular fora do plano;  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\nu$ : estiramento;  $\theta$ : respiração do anel. <sup>1,2,3 e 4</sup> referem-se aos trabalhos de Takeuchi e Harada (1986), Chuang e Chen (2009), Hernandez *et al.* (2010) e Hussain e Pang. (2015) Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.13. ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO P5

Nesta seção serão discutidos os dados espectroscópicos envolvendo Raman e SERS do p-Glu-Lys-Trp-Ala-Pro (P5). Este peptídeo é formado por uma sequência de 5 amino ácidos na seguinte ordem: p-Glutamina, lisina, triptofano, alanina, e prolina (p-Glu-Lys-Trp-Ala-Pro). O prefixo “p” na glutamina faz referência a formação de um ciclo. A Figura 55 pode facilitar o entendimento da estrutura deste pentapeptídeo.

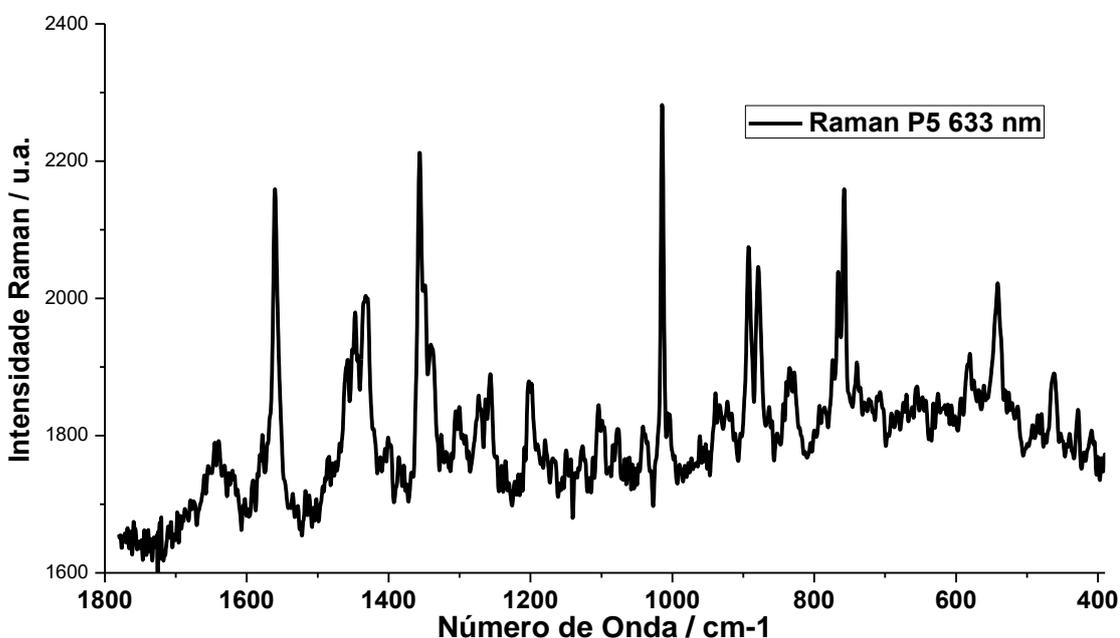
Figura 55 – Ilustração da estrutura do P5.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro Raman do P5 em estado sólido foi obtido sob a radiação excitante de 633 nm (Figura 56). As bandas mais intensas do espectro estão em 758, 1014, 1356, 1560  $\text{cm}^{-1}$ . É possível observar que mesmo na presença de outros aminoácidos, o Trp apresenta contribuição significativa para o espectro Raman. A região entre 1400 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  apresenta bandas com intensidades relativas mais significantes que no espectro do Trp. Outra diferença, consiste no aparecimento de uma banda intensa em 892  $\text{cm}^{-1}$  que não pode ser atribuído ao Trp.

Figura 56 – Espectro Raman do P5 em estado sólido.



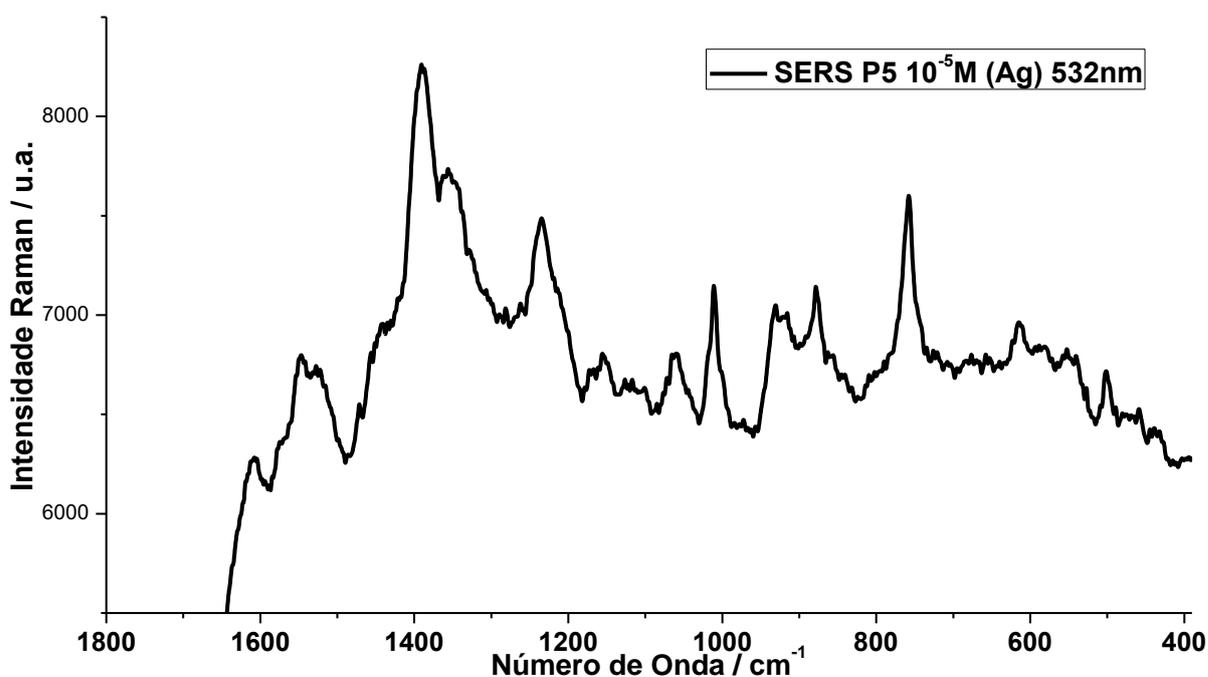
Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro SERS do P5 em prata (Figura 57) apresenta as bandas mais intensas em 758, 1011, 1235, 1356 e 1391  $\text{cm}^{-1}$ . Todas as bandas destacadas podem ser atribuídas ao anel

indólico, exceto pela banda em  $1391\text{ cm}^{-1}$ , que pode estar relacionada ao carboxilato da prolina. (Podstawka, Kafarski e Proniewicz, 2008; Carcamo *et al.*, 2012) A partir da comparação entre o espectro SERS em prata e o espectro Raman da molécula na forma sólida, pode-se inferir que a intensificação da banda em  $1391\text{ cm}^{-1}$  seja um indício da adsorção do peptídeo via carboxilato.

Figura 57 - Espectro SERS do P5 ( $10^{-5}\text{M}$ ) em prata.

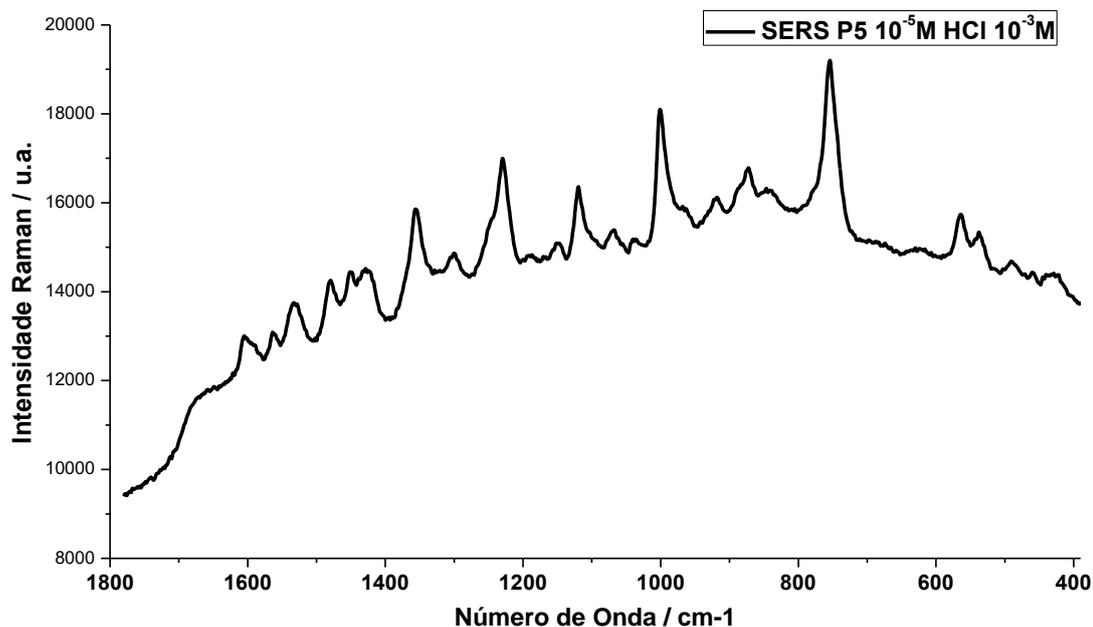


Legenda: Radiação excitante em 532 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A Figura 58 mostra o espectro SERS do P5 ( $1,0 \cdot 10^{-6}\text{M}$ ) em ouro, sob radiação excitante de 633 nm. Neste espectro, as 4 bandas mais intensas são  $754$ ,  $1001$ ,  $1230$  e  $1356\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas a  $\theta(R, r)$ ;  $\theta(R, r)$ ;  $\delta(\text{CH})R, r$  e  $\nu(\text{NC})r$ , respectivamente. Entre as menos intensas, destacam-se outras bandas associadas ao anel indólico em  $1533$ ,  $1564$  e  $1605\text{ cm}^{-1}$ . Há de se destacar ainda, a intensificação da banda em  $1230\text{ cm}^{-1}$ , apesar de não possuir alguma banda semelhante no espectro Raman, está presente em outros espectros SERS obtidos neste trabalho. A banda em  $564\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a modos fora do plano, indicando que o anel esteja inclinado em relação à superfície metálica. A partir de todas as características observadas e a comparação com espectros de estruturas mais simples, pode-se inferir que o P5 também possui o átomo de nitrogênio do anel indólico como sítio de interação com a nanosuperfície de ouro.

Figura 58 – Espectro SERS em ouro do P5  $10^{-6}$ M em presença de HCl  $10^{-3}$ M.



Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A Tabela 6 apresenta uma proposta de atribuição das bandas observadas baseado em trabalhos da literatura que atribuem o espectro do L-Trp.

Tabela 6 – Atribuição vibracional do espectro Raman e SERS do P5.

Raman	SERS	Atribuição
462 w		$\nu(\text{CC})\text{R},r$
580 w	564 w	$\phi(\text{C})\text{R},r, \phi(\text{CCC})\text{R}, \phi(\text{NH})r$
758 s	754 s	$\theta(\text{R},r)$
879 m	872m	$\delta(\text{CH})\text{R},r$
1014 s	1001 s	$\theta(\text{R},r)$
	1120 m	$\nu(\text{CC})\text{R}, \delta(\text{CH})\text{R},r$
	1230 s	$\delta(\text{CH})\text{R},r$
1340 sh		$\nu(\text{NC})r, \nu(\text{CC})\text{R}$
1356 s	1356s	$\nu(\text{NC})r, \nu(\text{CC})\text{R}$
1432 m	1429 m	$\nu(\text{CC})r, \text{R}$

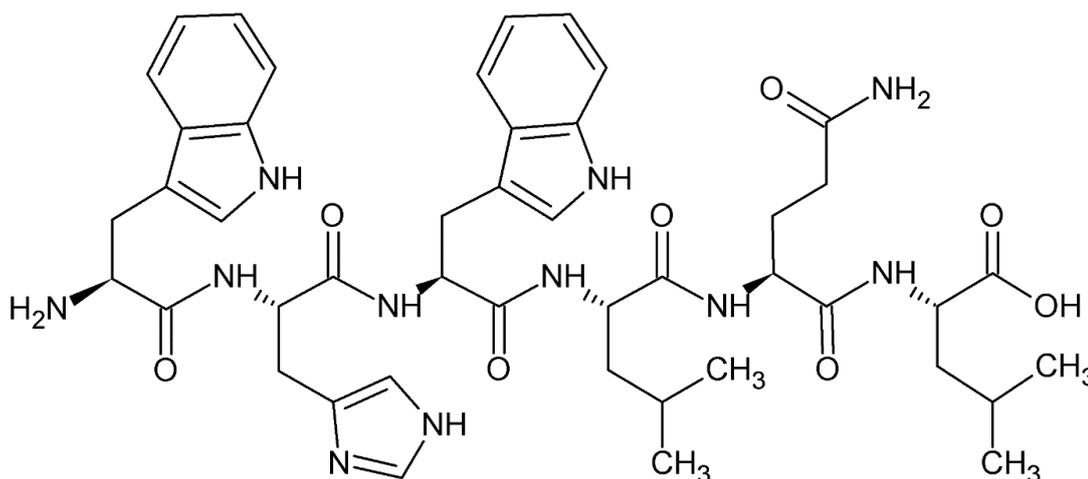
1458 sh	1451 m	$\delta(\text{CH})\text{R}$
	1478 m	
1560 s	1533 m	$\nu(\text{NC})\text{r}$
	1564 w	$\nu(\text{CC})\text{R}$
	1605 w	$\nu(\text{CC})\text{R, r}$
1620 sh		$\nu(\text{COO}^-)$

Legenda: Todos os valores estão em  $\text{cm}^{-1}$ . vw: muito fraca; w: fraca; m: média; s: forte; vs: muito forte.  $\phi$ : deformação angular fora do plano;  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\nu$ : estiramento;  $\theta$ : respiração do anel. <sup>1,2,3 e 4</sup> referem-se aos trabalhos de Takeuchi e Harada (1986), Chuang e Chen (2009), Hernandez *et al.* (2010) e Hussain e Pang. (2015). Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.14. ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO P6

O P6 é um oligopeptídeo formado por 6 amino ácidos, na seguinte sequência: Triptofano, histidina, triptofano, leucina, glutamina e leucina. A Figura 59 mostra uma representação ilustrativa da estrutura do P6.

Figura 59 – Representação ilustrativa do P6.

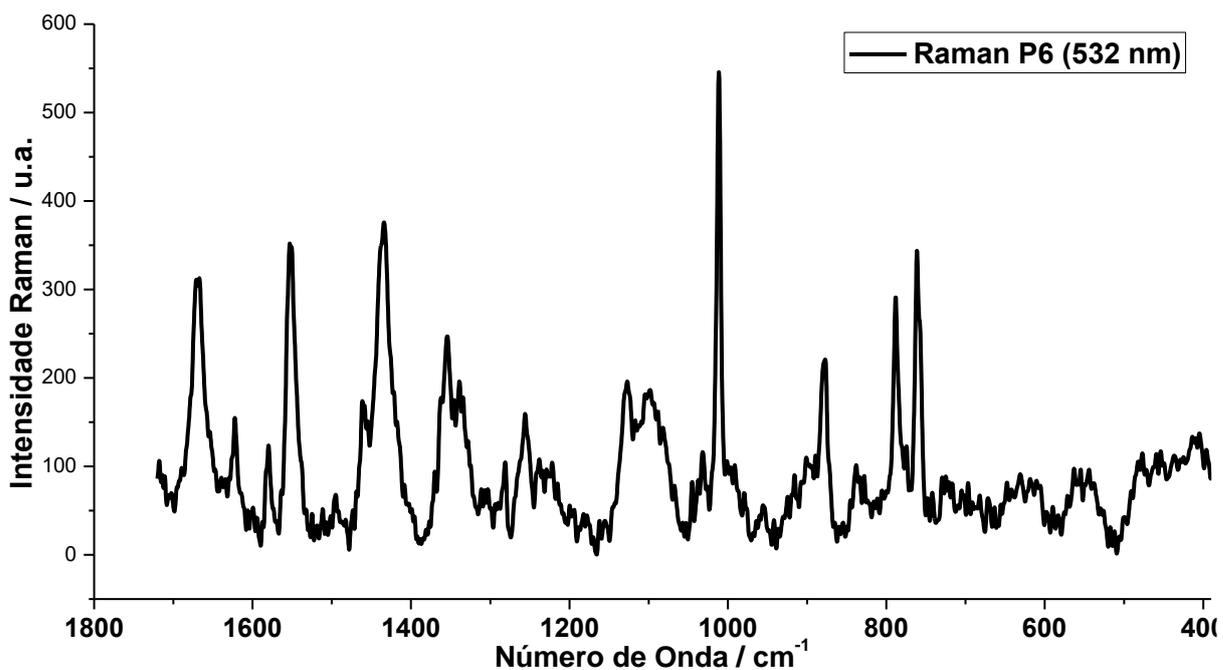


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Este peptídeo apresenta dois triptofano em sua estrutura, um é amino terminal, enquanto o outro encontra-se no meio da cadeia. O espectro Raman do P6 em estado sólido está apresentado na Figura 60 e possui a maioria das bandas mais intensas do espectro associadas ao triptofano. As bandas em 761, 877, 1011, 1339, 1354, 1434 e 1551  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao

anel indólico e mostram-se bastante intensas no espectro do hexapeptídeo. Há de se destacar que a presença de dois triptofanos em sua estrutura não apresentou mudanças significativas no padrão espectral.

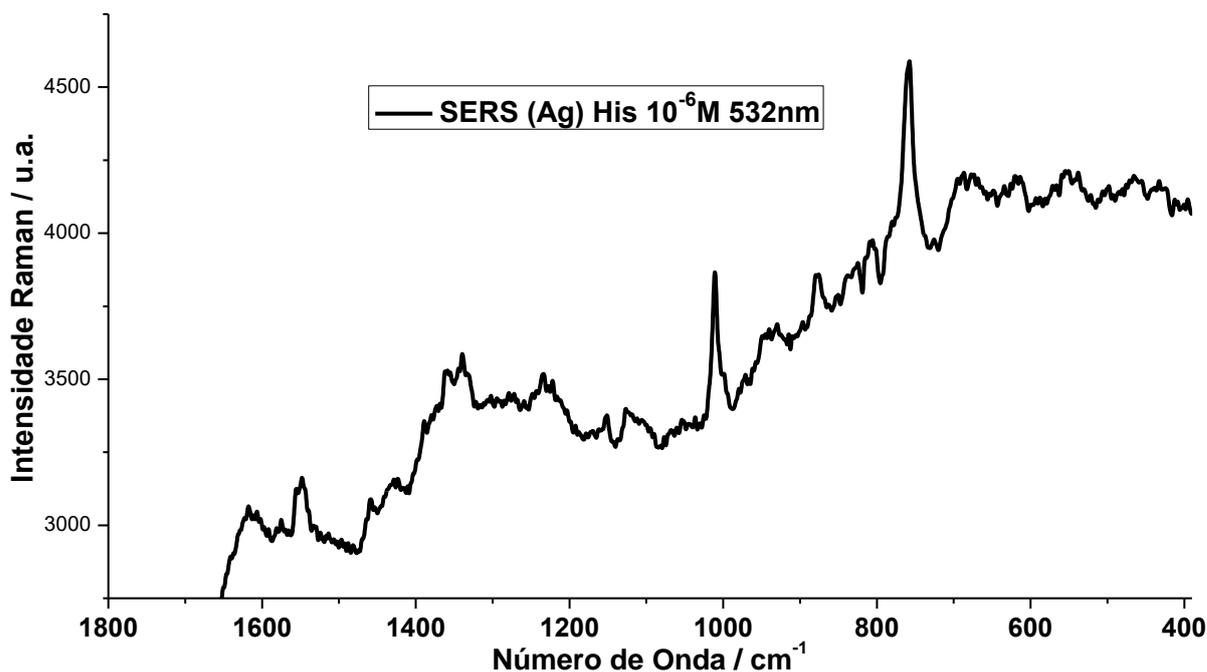
Figura 60 – Espectro Raman do P6 em estado sólido.



Legenda: Radiação excitante em 532 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro SERS do P6 em prata está apresentado na figura 61. As bandas mais intensas estão em 758, 876, 1011, 1339, 1359 e 1548  $\text{cm}^{-1}$ , todas atribuídas a estiramentos envolvendo átomos do anel indólico. O surgimento de um ombro na região de 1389  $\text{cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída ao carboxilato, é uma possível indicação da adsorção da molécula à superfície de prata. (Podstawka-Proniewicz *et al.*, 2011)

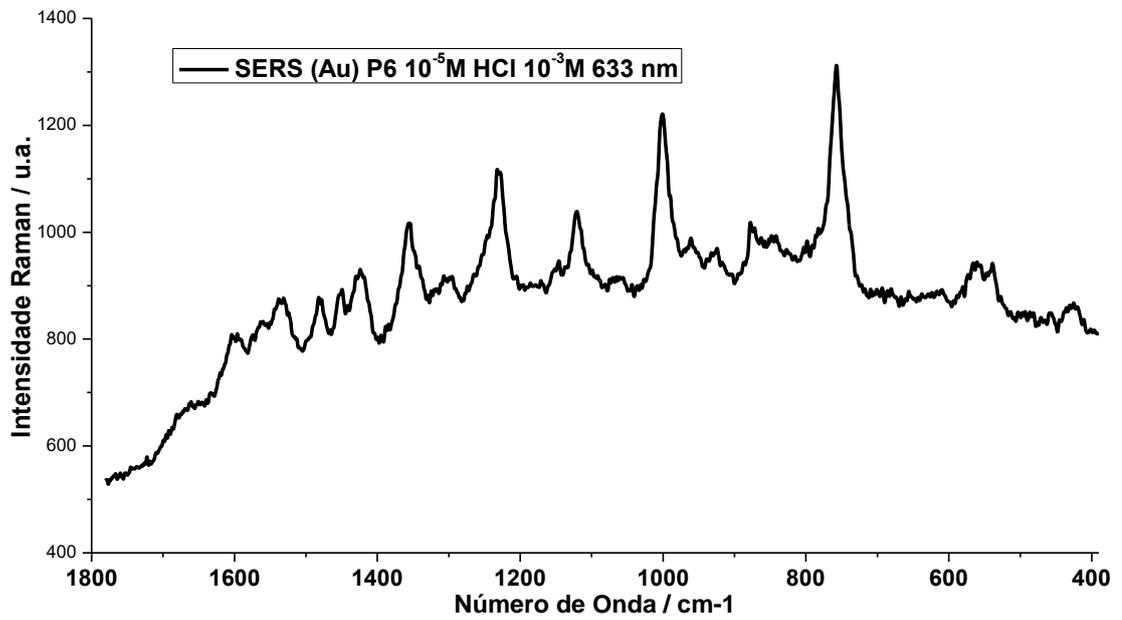
Figura 61 - Espectro SERS do P6 ( $10^{-6}$ M) em prata.

Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Foi realizado o experimento para a obtenção do espectro SERS em ouro sob a radiação excitante de 633 nm (Figura 62). Neste espectro pode-se perceber grande semelhança com o perfil espectral do P5. As bandas mais intensas estão em 757, 1001, 1232 e 1356  $\text{cm}^{-1}$ . Há de se destacar o deslocamento das bandas do anel para menor número de onda que caracterizam a adsorção através do nitrogênio do anel indólico. Outra característica relevante é o aparecimento de um ombro na banda em 1001  $\text{cm}^{-1}$  que coincide com a posição da banda no espectro Raman do sólido, sugerindo-nos a possibilidade de que apenas um dos triptofanos esteja adsorvido à superfície de ouro. Além disso, o perfil das bandas em 1360 e 1340 se assemelha mais aos perfis espectrais em prata e Raman do sólido, sendo assim mais uma evidência de que apenas um triptofano do peptídeo esteja adsorvido à superfície de ouro.

Figura 62 – Espectro SERS do P6 em ouro na presença de HCl  $10^{-3}$ M.



Legenda: Radiação excitante em 633 nm.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, tornou-se possível determinar a importância no controle de temperatura para a reprodutibilidade nas sínteses de AgNPs. A temperatura pode ser também um dos fatores para ajuste da ressonância do plasmon de superfície a fim de se obter maior intensificação SERS. Há de se destacar ainda, a dificuldade na obtenção de espectros SERS com outros adsorbatos que não fossem mercaptanas.

Os filmes finos mostraram atividade SERS razoáveis, contudo há a necessidade de alterar e ajustar alguns parâmetros para otimização dos mesmos.

A união de uma investigação espectroscópica com ferramentas computacionais mostrou-se extremamente útil para o entendimento da interação do MET com as AgNPs, permitindo compreender os sítios de adsorção bem como os motivos que levam à predominância de uma conformação em detrimento da outra. A ferramenta computacional utilizada não se mostra adequada para a simulação do efeito SERS, mas permite a obtenção de diversas informações relevantes para entender as interações entre pequenas moléculas e a superfície das nanoestruturas.

A análise dos perfis espectrais SERS do D-Trp e do L-Trp permitiu estabelecer padrões para determinação de qual grupo da molécula está participando mais efetivamente da adsorção: carboxilato e amina em superfície de prata, enquanto em ouro são indol e amina. A diminuição do pH possibilitou a obtenção de espectros em menor concentração de adsorbato, como também aumentou a intensidade da interação metal-molécula.

Os espectros SERS da Ala-Trp mostrou-se semelhante ao Trp, As diferenças observadas foram atribuídas a presença da alanina, provocando uma nova geometria de adsorção, mas através dos mesmos grupos. Os espectros do Trp-Gly diferenciaram-se dos demais, tanto em prata, quanto em ouro. A exceção ocorreu quando foi adicionado HCl, pois o espectro apresentou perfil semelhante ao observado anteriormente e corroborando a hipótese de maior intensidade na interação entre a molécula e a superfície.

A partir de toda informação coletada através dos espectros dos aminoácidos e dos dipeptídeos, foi possível concluir que a maioria das bandas do espectro eram do triptofano. Em razão do deslocamento e intensificação de bandas do anel, pôde-se concluir que todos os peptídeos estudados adsorveram pela coordenação do nitrogênio do indol à superfície de ouro.

Por último, há de se destacar que as nanopartículas de ouro apresentaram comportamento mais adequado para uso como substrato SERS, especialmente para excitação na região do vermelho.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALIAGA, A. E. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering study of L-tryptophan. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 40, n. 2, p. 164-169, Feb 2009. ISSN 0377-0486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263981000010 >.

ALIVISATOS, A. P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 933-937, Feb 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996TV70400031 >.

AROCA, R. **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**. John Wiley and Sons, 2006. 260 ISBN 978-0-471-60731-1.

ASHCROFT, N. W.; MERMIN, N. D. **Solid State Physics**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1976.

BARNARD, A. S. Modeling the Impact of Alkanethiol SAMs on the Morphology of Gold Nanocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 12, p. 5433-5441, Dec 2013. ISSN 1528-7483. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000328100400035 >.

BENITES, T. A. *et al.* Effects of surface roughness on properties of passivation of self-assembled organic monolayers. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1533-1537, 2014. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000344472500018 >.

BORN, M.; OPPENHEIMER, J. R. Zur Quantentheorie der Molekeln. **Annalen der Physik**, v. 84, p. 457-484, 1927.

BRITO-SILVA, A. M. **Fabricação e caracterização de compósitos fotônicos contendo nanopartículas dielétricas e metálicas**, 2011. 95 (Doutor em Ciências). Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

CAPELLE, K. A bird's-eye view of density-functional theory. **Brazilian Journal of Physics**, v. 36, n. 4A, p. 1318-1343, Dec 2006. ISSN 0103-9733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243070400035 >.

CARCAMO, J. J. *et al.* Proline and hydroxyproline deposited on silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 43, n. 6, p. 750-755, Jun 2012. ISSN 0377-0486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305391800012 >.

CHAKI, N. K. *et al.* Applications of self-assembled monolayers in materials chemistry. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences**, v. 113, n. 5-6, p. 659-670, Oct-Dec 2001. ISSN 0253-4134. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172588700022 >.

CHAKI, N. K.; VIJAYAMOCHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 1-2, p. 1-12, Jan 2002. ISSN 0956-5663. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173263200001 >.

CHUANG, C. H.; CHEN, Y. T. Raman scattering of L-tryptophan enhanced by surface plasmon of silver nanoparticles: vibrational assignment and structural determination. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 40, n. 2, p. 150-156, Feb 2009. ISSN 0377-0486. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000263981000008 >.

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 II**, v. 75, p. 790-798, 1979. ISSN 0300-9238. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1979HB60300006 >.

DARBY, B. L.; LE RU, E. C. Competition between Molecular Adsorption and Diffusion: Dramatic Consequences for SERS in Colloidal Solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 31, p. 10965-10973, Aug 2014. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000340079800031 >.

DE FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A.; SALA, O. Twenty years of SERS. **Quimica Nova**, v. 22, n. 4, p. 541-552, Jul-Aug 1999. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000081587600013 >.

DELRIO, F. W. *et al.* Structure-property relationships for methyl-terminated alkyl self-assembled monolayers. **Chemical Physics Letters**, v. 512, n. 4-6, p. 243-246, Aug 2011. ISSN 0009-2614. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293883900022 >.

DOUKETIS, C. *et al.* Self-affine silver films and surface-enhanced Raman scattering: Linking spectroscopy to morphology. **Journal of Chemical Physics**, v. 113, n. 24, p. 11315-11323, Dec 2000. ISSN 0021-9606. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000165841300052 >.

ECKERMANN, A. L. *et al.* Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 15-16, p. 1769-1802, Aug 2010. ISSN 0010-8545. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279659000012 >.

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

FERNSTROM, J. D. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. **Physiological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 484-546, 1983. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1983QP38000003 >.

FERTITTA, E.; VOLOSHINA, E.; PAULUS, B. Adsorption of Multivalent Alkylthiols on Au(111) Surface: Insights from DFT. **Journal of Computational Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 204-213, Jan 2014. ISSN 0192-8651. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000328813800004 >.

FLEISCHMANN, M. A.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN A. J. Raman-Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163--166, 1974. ISSN 0009-2614. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1974T347700004 >.

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

GAO, C. B. *et al.* Highly Stable Silver Nanoplates for Surface Plasmon Resonance Biosensing. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 51, n. 23, p. 5629-5633, 2012. ISSN 1433-7851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000304814000018 >.

GIANNOZZI, P. *et al.* QUANTUM ESPRESSO: a modular and open-source software project for quantum simulations of materials. **Journal of Physics-Condensed Matter**, v. 21, n. 39, p. 19, Sep 2009. ISSN 0953-8984. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000269626500008 >.

GOBIN, A. M. *et al.* Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. **Nano Letters**, v. 7, n. 7, p. 1929-1934, Jul 2007. ISSN 1530-6984. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247926400016 >.

GOLLNICK, P. *et al.* Complexity in regulation of tryptophan biosynthesis in *Bacillus subtilis*. In: (Ed.). **Annual Review of Genetics**. Palo Alto: Annual Reviews, v.39, 2005. p.47-68. (Annual Review of Genetics). ISBN 978-0-8243-1239-8.

GRONBECK, H.; CURIONI, A.; ANDREONI, W. Thiols and disulfides on the Au(111) surface: The headgroup-gold interaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 16, p. 3839-3842, Apr 2000. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000086766200005 >.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, Jun 2005. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227143800024 >.

HAO, E.; SCHATZ, G. C. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. **Journal of Chemical Physics**, v. 120, n. 1, p. 357-366, Jan 2004. ISSN 0021-9606. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000187577400045 >.

HARADA, I.; MIURA, T.; TAKEUCHI, H. Origin of the doublet at 1360 and 1340  $\text{cm}^{-1}$  in the raman-spectra of tryptophan and related-compounds. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular**

**and Biomolecular Spectroscopy**, v. 42, n. 2-3, p. 307-312, 1986. ISSN 0584-8539. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986C301300028 >.

HAYASHI, T.; MORIKAWA, Y.; NOZOYE, H. Adsorption state of dimethyl disulfide on Au(111): Evidence for adsorption as thiolate at the bridge site. **Journal of Chemical Physics**, v. 114, n. 17, p. 7615-7621, May 2001. ISSN 0021-9606. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000168168100036 >.

HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**, v. 16, n. 7-8, p. 262-271, Jul-Aug 2013. ISSN 1369-7021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000323927400013 >.

HERNANDEZ, B. *et al.* 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. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 46, p. 15319-15330, Nov 2010. ISSN 1520-6106. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000284287700063 >.

HERNE, T. M.; AHERN, A. M.; GARRELL, R. L. Surface-enhanced Raman-spectroscopy of peptides - preferential n-terminal adsorption on colloidal silver. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 3, p. 846-854, Jan 1991. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991EW17800018 >.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. **Physical Review B**, v. 136, n. 3B, p. B864-B871, 1964. ISSN 1098-0121. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A19641557C00018 >.

HU, J. W. *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy study on the structure changes of 4-mercaptopyridine adsorbed on silver substrates and silver colloids. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 58, n. 13, p. 2827-2834, Nov 2002. ISSN 1386-1425. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179137100004 >.

HUNT, L. B. The true story of Purple of Cassius. **Gold Bulletin**, v. 9, n. 4, p. 134-139, 1976.

HUSSAIN, S.; PANG, Y. Surface geometry of tryptophan adsorbed on gold colloidal nanoparticles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1096, p. 121-128, Sep 2015. ISSN 0022-2860. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000356550000014 >.

ITOH, T. *et al.* Experimental demonstration of the electromagnetic mechanism underlying surface enhanced Raman scattering using single nanoparticle spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry**, v. 219, n. 2-3, p. 167-179, Apr 2011. ISSN 1010-6030. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290882500001 >.

JIANG, Z. J.; LIU, C. Y.; SUN, L. W. Catalytic properties of silver nanoparticles supported on silica spheres. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 5, p. 1730-1735, Feb 2005. ISSN 1520-6106. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226779900017 >.

JIN, R. C. et al. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1901-1903, Nov 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172465000051 >

JUNG, H. S.; KIM, K.; KIM, M. S. Raman spectroscopic investigation of the adsorption of 4-mercaptopyridine on a silver-sol surface. **Journal of Molecular Structure**, v. 407, n. 2-3, p. 139-147, May 1997. ISSN 0022-2860. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XK45300007 >.

KANDAKKATHARA, A.; UTKIN, I.; FEDOSEJEVS, R. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Detection of Low Concentrations of Tryptophan Amino Acid in Silver Colloid. **Applied Spectroscopy**, v. 65, n. 5, p. 507-513, May 2011. ISSN 0003-7028. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289703200008 >.

KANG, J. S. et al. Sintering of Inkjet-Printed Silver Nanoparticles at Room Temperature Using Intense Pulsed Light. **Journal of Electronic Materials**, v. 40, n. 11, p. 2268-2277, Nov 2011. ISSN 0361-5235. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295365500014 >.

KELLY, K. L. *et al.* The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668-677, Jan 2003. ISSN 1520-6106. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180545300005 >.

KILIN, D. S.; PREZHDO, O. V.; XIA, Y. N. Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles: Ab initio study of preferential surface coordination with citric acid. **Chemical Physics Letters**, v. 458, n. 1-3, p. 113-116, Jun 2008. ISSN 0009-2614. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256284900024 >.

KIM, S. K.; KIM, M. S.; SUH, S. W. Surface-enhanced Raman-scattering (sers) of aromatic-amino-acids and their glycylic dipeptides in silver sol. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 18, n. 3, p. 171-175, May 1987. ISSN 0377-0486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987H019000004 >.

KNEIPP, K. *et al.* Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 10, p. 2957-+, Oct 1999. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083158200005 >.

KOHN, W. Nobel Lecture: Electronic structure of matter-wave functions and density functionals. **Reviews of Modern Physics**, v. 71, n. 5, p. 1253-1266, Oct 1999. ISSN 0034-6861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084544000001 >.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. 1133-1138, 1965. ISSN 0031-899X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A19657000000015 >.

KOKALJ, A.; CAUSÀ, M. **XcrySDen: (X-window) CRYstaline Structures and DENsities** 2003.

KONDOH, H. *et al.* Adsorption of thiolates to singly coordinated sites on Au(111) evidenced by photoelectron diffraction. **Physical Review Letters**, v. 90, n. 6, p. 4, Feb 2003. ISSN 0031-9007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181015900027 >.

KUDELSKI, A. Chemisorption of 2-mercaptoethanol on silver, copper, and gold: Direct Raman evidence of acid-induced changes in adsorption/desorption equilibria. **Langmuir**, v. 19, n. 9, p. 3805-3813, Apr 2003a. ISSN 0743-7463. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182467100036 >.

\_\_\_\_\_. Structures of monolayers formed from different HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-X thiols on gold, silver and copper: comparative studies by surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 34, n. 11, p. 853-862, Nov 2003b. ISSN 0377-0486. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186539200002 >.

KUZNETSOV, B. A. *et al.* Electrochemical investigation of binding sites of plantacyanin: Blue, copper-containing protein of plants. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 40, n. 2, p. 249-255, Aug 1996. ISSN 0302-4598. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996VN99500020 >.

LE RU, E.; ETCHEGOIN, P. **Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy**. First edition. Great Britain: Elsevier, 2009. 663.

LEE, H. I.; SUH, S. W.; KIM, M. S. Raman-spectroscopy of L-tryptophan-containing peptides adsorbed on a silver surface. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 19, n. 7, p. 491-495, Nov 1988. ISSN 0377-0486. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988Q769700009 >.

LEE, I.; LEE, J. W.; GREENBAUM, E. Biomolecular electronics: Vectorial arrays of photosynthetic reaction centers. **Physical Review Letters**, v. 79, n. 17, p. 3294-3297, Oct 1997. ISSN 0031-9007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997YC78200050 >.

LEE, J.-S. Silver nanomaterials for the detection of chemical and biological targets. **Nanotechnology Reviews**, v. 3, n. 5, p. 499-513, Oct 2014. ISSN 2191-9089. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000343317400005 >.

LEE, P. C.; MEISEL, D. ADSORPTION AND SURFACE-ENHANCED RAMAN OF DYES ON SILVER AND GOLD SOLS. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391-3395, 1982. ISSN 0022-3654. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1982PC66700025 >.

LOPEZ-TOBAR, E. *et al.* Anchoring Sites of Fibrillogenic Peptide Hormone Somatostatin-14 on Plasmonic Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 15, p. 8273-8279, Apr 2015. ISSN 1932-7447. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000353249500036 >.

MAKSYMOWYCH, P. *et al.* Surface bonding and dynamical behavior of the CH<sub>3</sub>SH molecule on Au(111). **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 47, p. 22463-22468, Dec 2005. ISSN 1520-6106. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233684500055 >.

MCCREERY, R. L. **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis**. New York: Wiley, 2000. 420 ISBN 9780471252870.

MCNAY, G. *et al.* 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, Aug 2011. ISSN 0003-7028. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293206800001 >.

METRAUX, G. S.; MIRKIN, C. A. Rapid thermal synthesis of silver nanoprisms with chemically tailorable thickness. **Advanced Materials**, v. 17, n. 4, p. 412-415, Feb 2005. ISSN 0935-9648. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227404900007 >.

MIE, G. Articles on the optical characteristics of turbid tubes, especially colloidal metal solutions. **ANNALEN DER PHYSIK**, v. 25, n. 3, p. 377-445, 1908.

MORIKAWA, Y. *et al.* First-principles theoretical study of alkylthiolate adsorption on Au(111). **Surface Science**, v. 507, p. 46-50, Jun 2002. ISSN 0039-6028. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000176583700010 >.

MORTON, S. M.; JENSEN, L. Understanding the Molecule-Surface Chemical Coupling in SERS. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 11, p. 4090-4098, Mar 2009. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264792700069 >.

MOSKOVITS, M. Surface selection-rules. **Journal of Chemical Physics**, v. 77, n. 9, p. 4408-4416, 1982. ISSN 0021-9606. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1982PM91500022 >.

\_\_\_\_\_. Surface-enhanced spectroscopy. **Reviews of Modern Physics**, v. 57, n. 3, p. 783-826, 1985. ISSN 0034-6861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985APC5700006 >.

NALLATHAMBY, P. D.; LEE, K. J.; XU, X. H. N. Design of stable and uniform single nanoparticle photonics for in vivo dynamics Imaging of nanoenvironments of zebrafish embryonic fluids. **ACS Nano**, v. 2, n. 7, p. 1371-1380, Jul 2008. ISSN 1936-0851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000257861900011 >.

NEWTON, L. *et al.* Self assembled monolayers (SAMs) on metallic surfaces (gold and graphene) for electronic applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 3, p. 376-393, 2013. ISSN 2050-7526. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314802200001 >.

NUZZO, R. G.; ZEGARSKI, B. R.; DUBOIS, L. H. Fundamental-studies of the chemisorption of organosulfur compounds on au(111) - implications for molecular self-assembly on gold surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 3, p. 733-740, Feb 1987. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987F932800017 >.

OH, J. H. *et al.* Recent advances in chemical functionalization of nanoparticles with biomolecules for analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 29, p. 8627-8645, Nov 2015. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000365169500001 >.

OTTO, A. The 'chemical' (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 6-7, p. 497-509, Jun-Jul 2005. ISSN 0377-0486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230829200005 >.

PATHEM, B. K. *et al.* Effect of Tether Conductivity on the Efficiency of Photoisomerization of Azobenzene-Functionalized Molecules on Au{111}. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, n. 17, p. 2388-2394, Sep 2012. ISSN 1948-7185. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308342500015 >.

PAYNE, M. C. *et al.* Iterative minimization techniques for *ab initio* total-energy calculations - molecular-dynamics and conjugate gradients. **Reviews of Modern Physics**, v. 64, n. 4, p. 1045-1097, Oct 1992. ISSN 0034-6861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992JV36300004 >.

PERDEW, J. P.; WANG, Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation-energy. **Physical Review B**, v. 45, n. 23, p. 13244-13249, Jun 1992. ISSN 1098-0121. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HZ24500006 >.

PERDEW, J. P.; ZUNGER, A. Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems. **Physical Review B**, v. 23, n. 10, p. 5048-5079, 1981. ISSN 0163-1829. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1981LR24700023 >.

PHILLIPS, K. S.; CHENG, Q. Recent advances in surface plasmon resonance based techniques for bioanalysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 5, p. 1831-1840, Mar 2007. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244335000029 >.

PINES, D. Collective energy losses in solids. **Reviews of Modern Physics**, v. 28, n. 3, p. 184-198, 1956. ISSN 0034-6861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1956WH64700003 >.

PODSTAWKA, E.; KAFARSKI, P.; PRONIEWICZ, L. M. Effect of an aliphatic spacer group on the adsorption mechanism on the colloidal silver surface of L-proline phosphonodipeptides. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 39, n. 12, p. 1726-1739, Dec 2008. ISSN 0377-0486. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262017700002 >.

PODSTAWKA, E.; OZAKI, Y.; PRONIEWICZ, L. M. Adsorption of S-S containing proteins on a colloidal silver surface studied by surface-enhanced Raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 58, n. 10, p. 1147-1156, Oct 2004. ISSN 0003-7028. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224815500002 >.

\_\_\_\_\_. Part III: Surface-enhanced Raman scattering of amino acids and their homodipeptide monolayers deposited onto colloidal gold surface. **Applied Spectroscopy**, v. 59, n. 12, p. 1516-1526, Dec 2005. ISSN 0003-7028. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234187500012 >.

PODSTAWKA-PRONIEWICZ, E. et al. Vibrational Characterization of L-Leucine Phosphonate Analogues: FT-IR, FT-Raman, and SERS Spectroscopy Studies and DFT Calculations. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 40, p. 11067-11078, Oct 2011. ISSN 1089-5639. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295545800028 >.

RADWANSKI, E. R.; LAST, R. L. Tryptophan biosynthesis and metabolism - biochemical and molecular-genetics. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 921-934, Jul 1995. ISSN 1040-4651. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995RM93700012 >.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. A new type of secondary radiation. **Nature**, v. 121, n. 3048, p. 501-502, 1928.

RAOOF, J. B. et al. Preparation of an electrochemical PNA biosensor for detection of target DNA sequence and single nucleotide mutation on p53 tumor suppressor gene corresponding oligonucleotide. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 157, n. 1, p. 195-201, Sep 2011. ISSN 0925-4005. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293436900028 >.

RIZZO, T. R. et al. Electronic-spectrum of the amino-acid tryptophan cooled in a supersonic molecular-beam. **Journal of Chemical Physics**, v. 83, n. 9, p. 4819-4820, 1985 1985. ISSN 0021-9606. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985ASR6300073 >.

\_\_\_\_\_. The electronic-spectrum of the amino-acid tryptophan in the gas-phase. **Journal of Chemical Physics**, v. 84, n. 5, p. 2534-2541, Mar 1 1986. ISSN 0021-9606. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986A427000013 >.

RUBINSTEIN, I. et al. Ionic recognition and selective response in self-assembling monolayer membranes on electrodes. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 426-429, Mar 31 1988. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988M727700051 >.

SAHA, K. *et al.* Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739-2779, May 2012. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303698000006 >.

SCHAECHTER, J. D.; WURTMAN, R. J. Serotonin release varies with brain tryptophan levels. **Brain Research**, v. 532, n. 1-2, p. 203-210, Nov 1990. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990EK05900029 >.

SCHOEN, D. T. *et al.* High Speed Water Sterilization Using One-Dimensional Nanostructures. **Nano Letters**, v. 10, n. 9, p. 3628-3632, Sep 2010. ISSN 1530-6984. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281498200068 >.

SHIN, K. *et al.* Structural stability of AgCu bimetallic nanoparticles and their application as a catalyst: A DFT study. **Catalysis Today**, v. 185, n. 1, p. 94-98, May 2012. ISSN 0920-5861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303109100014 >.

SIPIOR, J.; SULKES, M. Spectroscopy of tryptophan derivatives in supersonic expansions - addition of solvent molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 88, n. 10, p. 6146-6156, May 15 1988. ISSN 0021-9606. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988N555800015 >.

SIPIOR, J. *et al.* Lifetimes of individual conformational bands of jet-cooled tryptophan analogs - implications for nonexponential fluorescence decay of tryptophan and its analogs in solution. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 8, p. 2016-2018, Apr 9 1987. ISSN 0022-3654. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987G835500003 >.

SMEJKAL, P. *et al.* Testing anionic spacers by SERRS (surface-enhanced resonance Raman scattering) of a cationic free-base porphyrin in systems with laser-ablated Ag colloids. **Vibrational Spectroscopy**, v. 19, n. 2, p. 243-247, Apr 1999. ISSN 0924-2031. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000080327100012 >.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. International Agency for Research on Cancer, 2014. 630 ISBN 9789283204299.

STEWART, S.; FREDERICKS, P. M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 55, n. 7-8, p. 1641-1660, Jul 1999. ISSN 1386-1425. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000081025900030 >.

SUH, J. S.; MOSKOVITS, M. Surface-enhanced Raman-spectroscopy of amino-acids and nucleotide bases adsorbed on silver. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 16, p. 4711-4718, Aug 1986. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986D522600005 >.

SUN, Y. G.; XIA, Y. N. Triangular nanoplates of silver: Synthesis, characterization, and use as sacrificial templates for generating triangular nanorings of gold. **Advanced Materials**, v. 15, n. 9, p. 695-699, May 2003. ISSN 0935-9648. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182931000005 >.

TAKEUCHI, H. Raman structural markers of tryptophan and histidine side chains in proteins. **Biopolymers**, v. 72, n. 5, p. 305-317, 2003. ISSN 0006-3525. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185125500001 >.

TAKEUCHI, H.; HARADA, I. Normal coordinate analysis of the indole ring. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 42, n. 9, p. 1069-1078, 1986. ISSN 0584-8539. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986D937000021 >.

TARABARA, V. V.; NABIEV, I. R.; FEOFANOV, A. V. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of mercaptoethanol monolayer assemblies on silver citrate hydrosol. Preparation and characterization of modified hydrosol as a SERS-active substrate. **Langmuir**, v. 14, n. 5, p. 1092-1098, Mar 1998. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000072390800019 >.

THOMPSON, D. G. et al. Ultrasensitive DNA detection using oligonucleotide-silver nanoparticle conjugates. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 8, p. 2805-2810, Apr 2008. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254969100021 >.

TSUJI, M. *et al.* 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, Jun 2012. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305320700004 >.

\_\_\_\_\_. Synthesis and growth mechanism of triangular Ag-rich AgAu alloy prisms in an aqueous solution in the presence of PVP, citrate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Crystengcomm**, v. 15, n. 38, p. 7688-7695, 2013. ISSN 1466-8033.

TU, Q. A.; EISEN, J.; CHANG, C. Surface-enhanced Raman spectroscopy study of indolic molecules adsorbed on gold colloids. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 2, p. 3, Mar-Apr 2010. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278465300007 >.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, n. 11, p. 55-75, 1951. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1951UL20200007 >.

VIANNA, J. D. M.; FAZZIO, A.; CANUTO, S. **Teoria quântica de moléculas e sólidos**. São Paulo: Ed. Livraria da Física, 2004.

WEHLING, B.; HILL, W.; KLOCKOW, D. Cross-linking of organic-acid and isocyanate to silver sers substrates by mercaptoethanol. **Chemical Physics Letters**, v. 225, n. 1-3, p. 67-71, Jul 1994. ISSN 0009-2614. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994PA03700009 >.

YOURDSHAHYAN, Y.; ZHANG, H. K.; RAPPE, A. M. n-alkyl thiol head-group interactions with the Au(111) surface. **Physical Review B**, v. 63, n. 8, p. 4, Feb 2001. ISSN 1098-0121. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167203500022 >.

YU, H. X. et al. Thermal Synthesis of Silver Nanoplates Revisited: A Modified Photochemical Process. **ACS Nano**, v. 8, n. 10, p. 10252-10261, Oct 2014. ISSN 1936-0851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000343952600060 >.

ZENG, J. *et al.* Controlling the Shapes of Silver Nanocrystals with Different Capping Agents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 25, p. 8552-8553, Jun 2010. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279196500013 >.

ZHANG, Q. *et al.* 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. ISSN 1433-7851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000265950100027 >.

## APÊNDICE A – Teoria do Funcional da Densidade

A mecânica quântica foi desenvolvida a partir da intenção de se obter uma equação capaz de descrever, bem como prever o comportamento de sistemas quânticos. Assim como a mecânica de Newton funciona para o mundo macroscópico, a mecânica quântica descreve as propriedades de átomos, moléculas, etc. Em 1926 Schroedinger propôs uma equação que associaria uma função de onda ao comportamento de um ou mais corpos (Kohn, 1999):

$$\hat{H}\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = E\Psi(\vec{r}, \vec{R}) \quad (1)$$

onde  $\hat{H}$  é o operador Hamiltoniano,  $\Psi$  é a função de estado do sistema,  $E$  é a energia do sistema,  $\vec{r}$  e  $\vec{R}$  são respectivamente as coordenadas dos elétrons e dos núcleos.

O operador Hamiltoniano pode ser descrito explicitamente na seguinte expressão:

$$\hat{H} = - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \frac{1}{2} \sum_{\mu=1}^N \nabla_{\mu}^2 - \sum_{\mu=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|\vec{r}_{\mu} - \vec{R}_A|} + \sum_{\mu=1}^N \sum_{\nu < \mu}^N \frac{1}{|\vec{r}_{\mu} - \vec{r}_{\nu}|} + \sum_{A=1}^M \sum_{B < A}^M \frac{Z_A Z_B}{|\vec{R}_A - \vec{R}_B|} =$$

$$\hat{H} = \hat{T}_N + \hat{T}_e + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{NN} \quad (2)$$

$\hat{T}_N$  corresponde ao operador da energia cinética nuclear, enquanto  $\hat{T}_e$  é o operador da energia cinética dos elétrons, já os últimos três termos representam a energia potencial entre núcleo e elétron ( $\hat{V}_{Ne}$ ), elétron-elétron ( $\hat{V}_{ee}$ ) e núcleo-núcleo ( $\hat{V}_{NN}$ ).

A equação acima apresentará solução analítica apenas em alguns casos como o átomo de hidrogênio. Em casos que envolvam vários elétrons, o termo de interação entre eles e os núcleos não pode ser resolvido, levando ao uso de aproximações para o estudo destes sistemas.

A aproximação de Born-Oppenheimer propõe o desacoplamento entre os graus de liberdade dos núcleos e dos elétrons, resolvendo assim um dos termos problema para sistemas com vários elétrons (Born e Oppenheimer, 1927). Esta proposta baseia-se na diferença entre as massas, se ambos são expostos ao mesmo potencial, a capacidade de se reajustar, atingir um novo equilíbrio, será mais rápida naquele de massa menor. Como a massa do elétron é muito menor que o núcleo, ele irá se reajustar instantaneamente à mudança no potencial. Ou seja, em virtude da grande diferença nas velocidades relativas, pode-se considerar que os núcleos estejam parados quando comparado aos movimentos dos elétrons, permitindo então, obter um termo com coordenadas desacopladas entre núcleos e elétrons.

Apesar da alternativa encontrada, que tornam os termos envolvendo  $\vec{R}$  constantes, a interação entre elétrons permanece como um problema a ser resolvido. A Teoria do Funcional de Densidade (*Density Functional Theory* - DFT) será utilizada como ferramenta para a resolução da interação entre elétrons.

A DFT passa a descrever a energia total e outros observáveis como um funcional da densidade eletrônica ( $\rho(\vec{r})$ ), diferentemente do proposto originalmente, onde as propriedades eram obtidas a partir de uma função de onda. Dentre as vantagens deste método, destaca-se a necessidade de apenas 3 variáveis, as coordenadas espaciais de um ponto.

$$\rho(\vec{r}) = N \int d\vec{r}_2 \int d\vec{r}_3 \cdots \int d\vec{r}_N |\psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \cdots, \vec{r}_N)|^2 \quad (3)$$

Considerando que  $\vec{r}$  não representa um conjunto de N variáveis explicitamente. A teoria do Funcional da Densidade se baseia em dois teoremas propostos por Hohenberg e Kohn (1964), os quais são enunciados por:

**Teorema 1:** Existe uma correspondência biunívoca entre a densidade eletrônica do estado fundamental  $\rho(\vec{r})$ , e o potencial externo  $v_{ext}(\rho(\vec{r}))$ , a menos de uma constante, para um sistema de muitos elétrons.

A partir do enunciado acima, pode-se obter o potencial externo se conhecida a densidade eletrônica, além da função de onda eletrônica, a qual possibilita a obtenção das propriedades do sistema nesse estado. Ou seja, dada uma densidade eletrônica, qualquer propriedade do estado fundamental de um sistema pode ser determinada como um funcional de  $\rho(\vec{r})$ .

**Teorema 2:** A energia do estado fundamental é também um funcional único de  $\rho(\vec{r})$ , e atinge o valor mínimo quando  $\rho(\vec{r})$  é a verdadeira densidade eletrônica no estado fundamental do sistema.

Este teorema implica na existência de uma única densidade que pode minimizar a energia do sistema, a qual é atribuída ao estado fundamental, apesar de existir um número infinito de densidades possíveis. Além disso, torna possível o uso do princípio variacional para encontrar a energia do sistema fundamental. A energia será minimizada quando satisfizer a equação variacional:

$$\frac{\partial E(\rho(\vec{r}))}{\partial \rho(\vec{r})} = 0 \quad (4)$$

A seguir, a expressão da energia como funcional da densidade:

$$E(\rho(\vec{r})) = T_e(\rho(\vec{r})) + V_{ee}(\rho(\vec{r})) + \int \rho(\vec{r})v_{ext}(\rho(\vec{r}))d^3(\vec{r}) = T_e(\rho(\vec{r})) + V_{ee}(\rho(\vec{r})) + V_{ext}(\rho(\vec{r})) \quad (5)$$

Onde,  $T_e(\rho(\vec{r}))$  é o funcional da energia cinética,  $V_{ee}(\rho(\vec{r}))$  é o funcional da energia de interação coulombiana,  $V_{ext}(\rho(\vec{r}))$  é o funcional da energia potencial devida ao potencial externo,  $v_{ext}(\rho(\vec{r}))$ . A DFT é uma teoria exata, contudo o tratamento e formato do funcional universal  $T_e(\rho(\vec{r})) + V_{ee}(\rho(\vec{r}))$  ainda é desconhecido, devido à complexidade dos efeitos de muitos elétrons.

### Equação de Kohn-Sham

Uma maneira viável de se obter a minimização do funcional da energia foi proposta por Kohn-Sham (Kohn e Sham, 1965). A energia cinética  $T_e(\rho(\vec{r}))$  foi dividida em duas partes:  $T_s(\rho(\vec{r}))$  e  $T_c(\rho(\vec{r}))$ , o primeiro termo representa a energia cinética de um gás de partículas não interagentes, o último descreve a parcela da energia cinética devido a correlação eletrônica.

$$T_e(\rho(\vec{r})) = T_s(\rho(\vec{r})) + T_c(\rho(\vec{r})) \quad (6)$$

De forma análoga, o potencial elétron-elétron,  $V_{ee}(\rho(\vec{r}))$  pode ser reescrito como a soma de outros três termos:  $V_H(\rho(\vec{r}))$ , o qual descreve a interação Coulombiana entre os elétrons,  $V_x(\rho(\vec{r}))$ , representando a interação de troca, e  $V_c(\rho(\vec{r}))$ , que descreve a correlação de spin, responsável por aproximar elétrons de spin antiparalelos e afastar os elétrons de spin paralelos. A seguir, a energia eletrônica enunciada com os termos acima explícitos em função da densidade eletrônica:

$$E(\rho(\vec{r})) = T_s(\rho(\vec{r})) + T_c(\rho(\vec{r})) + V_H(\rho(\vec{r})) + V_x(\rho(\vec{r})) + V_c(\rho(\vec{r})) + V_{ext}(\rho(\vec{r})) \quad (7)$$

Os termos associados a muitos corpos,  $T_c(\rho(\vec{r}))$ ,  $V_x(\rho(\vec{r}))$  e  $V_c(\rho(\vec{r}))$  podem ser resumidos em um único termo  $E_{xc}(\rho(\vec{r}))$ , o qual é chamado por potencial de correlação e troca. A forma explícita de  $T_s(\rho(\vec{r}))$  como um funcional da densidade eletrônica não é conhecida, contudo esse termo pode ser descrito em termos dos orbitais  $\phi_i(\vec{r}_i)$  de um sistema não interagente com densidade  $\rho(\vec{r})$ . Então pode-se reescrever a equação 8 como (Capelle, 2006):

$$E(\rho(\vec{r})) = T_s(\phi_i(\rho(\vec{r}))) + V_H(\rho(\vec{r})) + E_{xc}(\rho(\vec{r})) + V_{ext}(\rho(\vec{r})) \quad (8)$$

A equação acima é exata e sua condição de minimização é representada a seguir:

$$0 = \frac{\partial E(\rho(\vec{r}))}{\partial \rho(\vec{r})} = \frac{\partial T_s(\phi_i(\rho(\vec{r})))}{\partial \rho(\vec{r})} + \frac{\partial V_H(\rho(\vec{r}))}{\partial \rho(\vec{r})} + \frac{\partial E_{xc}(\rho(\vec{r}))}{\partial \rho(\vec{r})} + \frac{\partial V_{ext}(\rho(\vec{r}))}{\partial \rho(\vec{r})} = \frac{\partial T_s(\phi_i(\rho(\vec{r})))}{\partial \rho(\vec{r})} + v_H(\rho(\vec{r})) + v_{xc}(\rho(\vec{r})) + v_{ext}(\rho(\vec{r})) \quad (9)$$

Sendo que,  $\frac{\partial T_s(\phi_i(\rho(\vec{r})))}{\partial \rho(\vec{r})}$  é o potencial gerado pela cinética das partículas não interagentes, o segundo termo representa o potencial de Hartree, ou seja, a interação entre o elétron e a densidade média de carga dos outros elétrons, o  $v_{xc}(\rho(\vec{r}))$  representa o potencial de troca e correlação, o qual inclui os termos não triviais da interação, o último termo descreve o potencial externo gerado pelos núcleos atômicos. Como  $T_s(\rho(\vec{r}))$  pode ser descrito por um funcional dos orbitais, ele não será minimizado diretamente pela densidade eletrônica, por isso, uma forma equivalente da equação será:

$$0 = \frac{\partial T_s}{\partial n_s} + v_{ef}^{KS}(\vec{r}) \quad (10)$$

onde,  $v_{ef}^{KS}(\vec{r})$  constitui a soma dos termos  $v_H(\vec{r})$ ,  $v_{xc}(\vec{r})$  e  $v_{ext}(\vec{r})$ , o qual é potencial efetivo devido a todos os elétrons, por isso, torna-se possível calcular a energia do sistema através da seguinte equação:

$$\left[ -\frac{\hbar^2 \nabla^2}{2m} + v_{ef}^{KS}(\vec{r}) \right] \phi_i^{KS}(\vec{r}) = \varepsilon_i \phi_i^{KS}(\vec{r}) \quad (11)$$

A equação 11, a qual apresenta o mesmo formato da equação para partículas independentes, é conhecida como a equação de Kohn-Sham. A qual deve ser resolvida de forma iterativa, ou seja, primeiro realiza-se o cálculo com uma densidade inicial, encontra-se a equação de Kohn-Sham, a qual é diagonalizada para a obtenção dos auto-vetores e auto-valores e assim uma nova densidade é encontrada.

A equação 11 permite observar que a equação e N partículas interagentes é substituída por N equações de uma única partícula. A expressão 12 permite a obtenção da energia eletrônica total:

$$E(\rho(\vec{r})) = \sum_i^N \varepsilon_i - \frac{e^2}{2} \int \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r}-\vec{r}'|} d^3 d^3 + E_{xc}(\rho(\vec{r})) - \int \rho(\vec{r})v_{ext}(\rho(\vec{r}))d^3(\vec{r}) \quad (12)$$

Onde o primeiro termo representa a soma dos autoestados, o segundo a interação eletrostática entre os elétrons,  $E_{xc}(\rho(\vec{r}))$  a energia de correlação e troca e o último a interação

do potencial externo com os elétrons do sistema. A expressão traria o resultado exato, porém o funcional de correlação e troca não é conhecido em termos da densidade eletrônica, por isso diversas aproximações são feitas para o tratamento deste funcional, neste trabalho utilizou-se a aproximação do gradiente generalizado (GGA).

### **Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA)**

A solução da equação de Kohn-Sham é dependente da descrição do potencial de troca e correlação. O teorema de Hohenberg-Kohn garante a existência deste termo, contudo a forma explícita deste não é conhecida, por isso faz-se necessário a utilização de aproximações.

A aproximação da densidade local (*Local Density Approximation* - LDA) é a mais simples entre as utilizadas. A LDA considera um gás de elétrons não homogêneo como localmente homogêneo, em outras palavras, a densidade varia de maneira muito lenta nas proximidades de um ponto que pode ser considerado localmente homogêneo (Perdew e Zunger, 1981). Naturalmente pela forma como está enunciada, esta aproximação se faz inadequada para situações nas quais a densidade de elétrons local não é homogênea. Uma possibilidade para contornar este problema consiste em expressar a energia de troca não só em relação a função de densidade de partículas como também em relação ao gradiente da função, por isso recebe o nome de aproximação do gradiente generalizado (*Generalized Gradient Approximation* - GGA) (Capelle, 2006).

$$E_{xc}^{GGA}(\rho(\vec{r})) = \int \rho(\vec{r}) \epsilon_{xc}(\rho(\vec{r})) F_{xc}(\rho(\vec{r}), |\nabla\rho(\vec{r})|) d^3\vec{r} \quad (13)$$

Neste trabalho será usado a implementação PW91, ela difere-se de outras na escolha da função  $F_{xc}(\rho(\vec{r}), |\nabla\rho(\vec{r})|)$  (Perdew e Wang, 1992).

### **Estrutura eletrônica dos sólidos**

A rede de Bravais é um sistema infinito de pontos que possuam arranjo regular em todo o espaço, por conta desta simetria translacional, torna-se possível representar todos os pontos da rede a partir de uma célula unitária. Ou seja, um cristal, sistema de infinitos átomos, pode ser representado a partir da repetição de uma célula unitária. Se cada ponto representa a posição de um núcleo atômico que compõe o sólido, pode-se deduzir a presença de um potencial

periódico nesta estrutura. Ou ainda, a energia potencial deste sistema pode ser descrita de acordo com a periodicidade da rede em estudo (Vianna, Fazzio e Canuto, 2004):

$$V(\vec{r} + \vec{R}_n) = V(\vec{r}) \quad (14)$$

Sendo  $\vec{R}_n$  um vetor de translação que leva de um ponto da rede a outro.

A partir da célula unitária definida na rede de Bravais, três vetores primitivos de translação  $\vec{a}_1, \vec{a}_2$  e  $\vec{a}_3$ , não coplanares, podem ser escolhidos como base. O vetor  $\vec{R}_n$  pode ser reescrito da seguinte maneira:

$$\vec{R}_n = \sum_{i=1}^3 l_{ni} \vec{a}_i \quad (15)$$

Onde  $l_{ni}$  ( $i=1, 2, 3$ ) é um número inteiro.

Em virtude da condição de contorno periódica imposta pela simetria translacional, o sistema antes considerado infinito, passa a ter um caráter finito pela definição da célula unitária.

O teorema de Bloch afirma que, para um sólido periódico, cada função de onda pode ser escrita como o produto de duas funções, uma com a forma de uma onda plana e outra com a mesma periodicidade da rede, ou seja (Ashcroft e Mermin, 1976; Payne *et al.*, 1992):

$$\Psi_i^{KS}(\vec{r}) = e^{i\vec{k}\vec{r}} u_i(\vec{r}) \quad (16)$$

Sendo,  $\vec{k}$  o vetor de onda e  $u_i(\vec{r})$  a função com a mesma periodicidade da rede.

A expansão da função através de um conjunto de base discretas de ondas planas, onde os vetores de onda serão os vetores da rede recíproca do cristal, permite escrever as funções de onda eletrônica do cristal como uma soma de ondas planas:

$$u_i(\vec{r}) = \sum_{\vec{G}} c_{i,\vec{G}} e^{i\vec{G}\vec{r}} \quad (17)$$

A partir da consideração acima, cada função de onda eletrônica pode ser reescrita como uma soma de ondas planas,

$$\Psi_{i,k}^{KS}(\vec{r}) = \sum_{\vec{G}} c_{i,k+\vec{G}} e^{i(\vec{k}+\vec{G})\vec{r}} \quad (18)$$

Para um dado conjunto de vetores  $\vec{R}_n$ , os quais constituem uma rede de Bravais, e uma onda plana  $e^{i\vec{k}\vec{r}}$ , um vetor de onda não permitirá que qualquer onda plana possua a mesma periodicidade da rede de Bravais. Apenas determinados vetores de onda possuirão tal

característica. Por isso, o conjunto de todos os vetores que produzem ondas planas com a mesma periodicidade de uma dada rede de Bravais é chamada rede recíproca (Ashcroft e Mermin, 1976). Um vetor de onda pertence a rede recíproca de uma rede de Bravais de pontos se, e somente se:

$$e^{i\vec{k}\cdot(\vec{r}+\vec{R})} = e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} \quad (19)$$

para qualquer  $\vec{r}$  e qualquer  $\vec{R}$  da rede de Bravais.

Em um primeiro momento, seria necessário um conjunto infinito de ondas planas para expandir uma função de onda eletrônica, contudo, os coeficientes  $c_{i,\vec{G}}$  para as ondas planas com energia cinética menor que  $(\hbar/2m)|\vec{k} + \vec{G}|^2$ , geralmente, se mostram mais importantes que aqueles relacionados com energias cinéticas mais elevadas. Por isso, pode-se fazer o truncamento do conjunto de base de ondas planas para que inclua somente aquelas com energia menor a uma energia particular, conhecida como energia de corte (Payne *et al.*, 1992).

### **Aproximação do pseudo-potencial**

Nesta aproximação, o átomo, formado por todos os elétrons e o núcleo, é substituído por um pseudo-átomo, na qual temos os elétrons de valência e um caroço iônico. Onde o caroço inclui o núcleo e elétrons mais internos mantidos nos seus estados atômicos. Isto facilita a resolução de problemas, ao mesmo tempo que não compromete as propriedades químicas do material. Esta aproximação considera que os elétrons do caroço estão fortemente ligados e por isso não participam na formação de ligações químicas, portanto, não se alteram em virtude dos diferentes ambientes químicos aos quais o átomo é exposto.

### **Otimização de Geometria**

A otimização de geometria constitui uma etapa importante para o estudo das propriedades químicas do objeto em estudo. Nesta etapa há de se procurar a geometria correspondente ao mínimo de energia da estrutura, então lança-se mão de um método que determine a força resultante em cada átomo, e sendo esta seja maior que o critério de convergência, mude a posição dos átomos. As novas forças sobre os átomos, induzida pelo deslocamento e outros átomos, são avaliadas até a obtenção do mínimo de energia.