

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

Aline Luciano Filgueiras

**Estudo *in vitro* do potencial antibacteriano de nanopartículas de prata, associadas à quitosana e antibióticos e das interações com a superfície metálica por espectroscopia Raman intensificada por superfície**

Juiz de Fora

2013

Aline Luciano Filgueiras

**Estudo *in vitro* do potencial antibacteriano de nanopartículas de prata, associadas à quitosana e antibióticos e das interações com a superfície metálica por espectroscopia Raman intensificada por superfície**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Sant'Ana

Juiz de Fora

2013

*Dedico esta dissertação aos meus pais  
Ana Lucia Luciano Filgueiras e  
Sebastião Filgueiras Filho.*

*“O que sabemos é uma gota.  
O que ignoramos é um oceano.”  
Isaac Newton*

## **Agradecimentos**

A Deus em primeiro lugar por mais essa conquista.

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

Ao Prof. Gustavo Fernandes Souza Andrade pelos ensinamentos e pela atenção despendida sempre nos momentos em que precisava.

Ao Prof. Cláudio Galuppo Diniz e à mestranda Mariana Lopes pela realização dos testes biológicos.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concebida durante esses anos.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa realizada.

Aos pesquisadores do INMETRO que sempre nos receberam muito bem e pela realização das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

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

Às amigas Dhieniffer Ferreira, Tatiana Bittercourt e Vanessa End pelo companheirismo, atenção e ajuda durante esses anos.

Aos amigos Bruno, Linus, Flávia Campos, Gabriela, Stefany, Michelly, Caroline, Lucas, Nelson, Humberto, Thaeny, Silvioney, Isabela, Flávia Maria, Tamires, Douglas, Regina e Lenize pela ajuda sempre que precisei e pelas brincadeiras na hora de distração.

A meus pais Ana Lucia Luciano Filgueiras e Sebastião Filgueiras Filho pelo apoio, dedicação e carinho todos esses anos.

A minha irmã Márcia Luciano Filgueiras pelos conselhos e amizade.

Ao meu amor, Artur Afonso Guedes Rossini pelo carinho, incentivo e por estar ao meu lado sempre nas horas que precisei.

## RESUMO

Neste trabalho investigou-se diferentes sínteses de nanopartículas de prata (AgNPs), misturadas ou não com antibióticos e misturadas ou não com quitosana com o objetivo de verificar as propriedades antibacterianas das misturas, e as interações químicas dos adsorbatos na superfície das AgNPs através da técnica de Espectroscopia por espalhamento Raman Intensificada por Superfície (SERS). A proposta considera uma alternativa para o uso de antibióticos, devido a um número crescente de linhagens bacterianas resistentes. Os testes biológicos contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis* foram realizados em colaboração com Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Nos testes biológicos verificou-se que algumas associações de AgNPs, quitosana e os antibióticos levofloxacina (LV), tetraciclina (TC), rifampicina (RP), benzilpenicilina (BP), meropenem (MP), ampicilina (AP), amicacina (AC), gentamicina (GT), vancomicina (VC) e oxacilina (OC) promoveram a intensificação do efeito antibacteriano de forma sinérgica. Também foram obtidos os espectros SERS dos antibióticos LV, TC, BP e RP e realizados os cálculos teóricos dos modos normais de vibração dos complexos destas espécies com prata, em colaboração com o Núcleo de Estudos em Química Computacional do departamento de química da UFJF. Com isso, foi possível realizar as atribuições vibracionais dos espectros Raman dos compostos sólidos e SERS das espécies adsorvidas, inferindo-se assim as geometrias de adsorção.

Palavras chave: Nanopartículas, SERS, antibiótico, sinergia.

## ABSTRACT

In this work were investigated several synthesis of silver nanoparticles (AgNPs), mixed or not with antibiotics and mixed or not with chitosan, in order to verify the antibacterial properties of the mixtures and the chemical interaction of the adsorbates with silver surface by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) spectroscopy. The proposal consists in an alternative for antibiotic use, due to a large number of resistant bacteria strains. The biological tests against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus epidermidis* were made in collaboration with the Laboratório de Fisiologia e Genética Bacteriana in the Instituto de Ciências Biológicas of the Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). In biological tests, some associations of the AgNPs and chitosan and the antibiotics levofloxacin (LV), benzylpenicillin (BP), tetracycline (TC), rifampicina (RP), meropenem (MP), amikacin (AC), gentamicin (GT), ampicillin (AP), oxacillin (OC) promotes the antibacterial effect in a synergic mechanism. Also were obtained the SERS spectra of LV, TC, BP and RP and the vibrational assignment were obtained by density functional theory (DFT) calculations. Such work was made in collaboration with the Núcleo de Estudos em Química Computacional from the Departamento de Química of the UFJF. In this way, it was possible to perform the vibrational assignment of the Raman spectra of the solid compounds and the SERS spectra of the adsorbed species, inferring the adsorption geometries.

Keywords: Nanoparticles, SERS, antibiotics, synergy.

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Evolução da separação da banda de valência e da banda de condução com o aumento do número de átomos de uma nanopartícula (NP). (Morton, Silverstein e Jensen, 2011) .....	23
<b>Figura 2:</b> Variação do nível de Fermi do metal em função do potencial aplicado no eletrodo e em relação às energias do HOMO e LUMO do adsorbato. $E_{F_m}$ =energia do nível de Fermi do metal, $DE_m$ =densidade eletrônica do metal, $V_{ap}$ = potencial aplicado, $V_{ox}$ = potencial de oxidação do adsorbato, $V_{red}$ =potencial de redução do adsorbato, $E_{TC}(M-A)$ = energia de transferência de carga metal adsorbato, $E_{CT}(A-M)$ = energia de transferência de carga adsorbato metal. (Rubim <i>et al.</i> , 1995) .....	24
<b>Figura 3:</b> Imagem TEM da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sem interação com AgNPs(a) e com interação com as AgNPs(b) (Morones <i>et al.</i> , 2005) .....	31
<b>Figura 4:</b> Imagem TEM da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com interação com as AgNPs penetrando no interior da célula bacteriana (Morones <i>et al.</i> , 2005).....	31
<b>Figura 5:</b> Processo de obtenção da quitosana a partir da desacetilação alcalina da quitina.....	32
<b>Figura 6:</b> Fórmula estrutural geral das penicilinas.....	33
<b>Figura 7:</b> Fórmula estrutural do meropenem.....	35
<b>Figura 8:</b> Fórmula estrutural do levofloxacino .....	37
<b>Figura 9:</b> Fórmula estrutural da tetraciclina.....	38
<b>Figura 10:</b> Fórmula estrutural da rifampicina .....	38
<b>Figura 11:</b> Fórmula estrutural da vancomicina .....	39
<b>Figura 12:</b> Espectro de extinção das AgNPs preparadas de acordo com a modificação da síntese descrita por (Grabar <i>et al.</i> , 1996). Caminho óptico: 1cm; Diluição: 10x.....	48
<b>Figura 13:</b> Espectros de extinção do col 2 preparado com e sem adição de HAc 0,1mol.L <sup>-1</sup> e QUIT 0,2g.L <sup>-1</sup> . Caminho óptico: 1cm; Diluição 10x .....	49
<b>Figura 14:</b> Espectro de extinção do col 2 preparado com adição de QUIT 0,2g.L <sup>-1</sup> e HAc 0,1mol.L <sup>-1</sup> com ampliação na região 600-1100nm.....	50
<b>Figura 15:</b> Espectro de extinção dos coloides 3, preparados com e sem adição de QUIT e HAc .....	51
<b>Figura 16:</b> Espectro de extinção do col 3 preparado em 4 preparações. Caminho óptico 1 cm.	52
<b>Figura 17:</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura do col 3F. (A) maior magnificação e (B) menor magnificação.....	53
<b>Figura 18:</b> Espectro de extinção das AgNPs preparadas utilizando 16.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> de AgNO <sub>3</sub> e 3,4.10 <sup>-4</sup> (col 4A) ou 5,6.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> (col 4B) de Na <sub>3</sub> Cit para a estabilização e cobertura das AgNPs. Caminho óptico: 0,1cm.....	55

<b>Figura 19:</b> Espectro de extinção do col 4 obtidos 8 meses após a síntese do coloide.....	56
<b>Figura 20:</b> Imagens SEM do col 4A recém preparado.....	57
<b>Figura 21:</b> Imagens MEV do col 4A obtidas após 8 meses de síntese. (A) maior magnificação e (B) menor magnificação.....	58
<b>Figura 22:</b> Espectro de extinção das AgNPs preparadas variando a concentração de AgNO <sub>3</sub> , Na <sub>3</sub> Cit, AA, QUIT e sementes de prata na reação .....	59
<b>Figura 23:</b> Imagem MEV do col 5C .....	60
<b>Figura 24:</b> Espectros SERS do CV 1.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> utilizando o col 4A, col 4B e o col 5C. $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ .....	66
<b>Figura 25:</b> Espectro SERS do CV 1,0.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> utilizando o col 4A como substrato SERS (A). Espectro Raman da solução de CV 1,0.10 <sup>-2</sup> mol.L <sup>-1</sup> . $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ (B).....	67
<b>Figura 26:</b> Espectros de extinção normalizados do col 4A, na presença de BP 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> , obtidos ao longo do tempo após a adição da BP e espectro de absorção da BP 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> ....	68
<b>Figura 27:</b> Espectros de extinção normalizados do col 4A, na ausência e na presença de BP 1.10 <sup>-4</sup> e 1.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> e espectro de absorção da solução aquosa de BP 1.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> Caminho óptico: 0,1cm.....	69
<b>Figura 28:</b> Geometria otimizada da BPH.....	70
<b>Figura 29:</b> Espectro Raman da BPH sólida $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ (A). Espectro Raman calculado da BPH isolada (B) .....	71
<b>Figura 30:</b> Geometria otimizada da BP desprotonada interagindo com quatro átomos de prata. Os átomos de hidrogênio foram omitidos .....	73
<b>Figura 31:</b> Espectros SERS da BP <sup>-</sup> 1,0.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> obtido utilizando coloide de prata (col 4A) e $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ (A) e $\lambda_0 = 532\text{nm}$ (B). Espectro Raman calculado do complexo Ag <sub>4</sub> -BP <sup>-</sup> . Espectros SERS com linha base ajustada com 20 pontos para melhor visualização das bandas (C) .....	74
<b>Figura 32:</b> Espectros de extinção do col 4A, do col 4A na presença de LV 1.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> . Espectro de absorção da LV 1.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> . Caminho óptico: 1cm .....	77
<b>Figura 33:</b> Espectros de extinção do col 4A, do col 4A na presença de LV 1.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> . Espectro de absorção da LV 1.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> . Caminho óptico: 1cm .....	78
<b>Figura 34:</b> Comparação do espectro de extinção do col 4A após adsorção da LV 1.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> com a soma dos espectros de extinção do col 4A e de absorção da LV 1.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> . Caminho óptico: 1,0cm.....	79
<b>Figura 35:</b> Geometria otimizada da LVH .....	80
<b>Figura 36:</b> Espectros Raman da LVH sólida utilizando $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ (A) e $\lambda_0=638\text{nm}$ (B); espectro Raman calculado da LVH isolada (C) .....	81

<b>Figura 37:</b> Geometria otimizada da LVH <sup>±</sup> interagindo com dois átomos de prata.....	83
<b>Figura 38:</b> Espectros SERS da LVH <sup>±</sup> 1,0.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> obtidos utilizando colóide de prata (col 4A), com excitação em $\lambda_0 = 638\text{nm}$ (A) e $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ (B); espectro Raman calculado do complexo Ag <sub>2</sub> LVH <sup>±</sup> (C).....	84
<b>Figura 39:</b> Estudo da cinética de agregação do col 4B na presença de 2-mercaptoetanol 1,0.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> e 2,0.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> .....	86
<b>Figura 40:</b> Geometria otimizada da RP. Os átomos de hidrogênio foram omitidos .....	87
<b>Figura 41:</b> Espectro Raman da RP sólida $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ (A). Espectro Raman da RP 1,0.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> $\lambda_0=638\text{nm}$ (B). Espectro Raman calculado da RP isolada (C).....	88
<b>Figura 42:</b> Geometria otimizada da RP interagindo com seis átomos de prata .....	90
<b>Figura 43:</b> Fórmula estrutural da RP.....	91
<b>Figura 44:</b> Espectro SERS da RP 1,0.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> obtido utilizando colóide de prata com 2-mercaptoetanol, $\lambda_0 = 638\text{nm}$ e função <i>smoothing</i> modo <i>adjacent average</i> com 10 pontos para melhor clareza do espectro SERS (A). Espectro SERS da RP 1,0.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> obtido utilizando colóide de prata (col 4A) com 2-mercaptoetanol e $\lambda_0 = 638\text{nm}$ (B). Espectro Raman calculado do complexo Ag <sub>6</sub> RP(C).....	92
<b>Figura 45:</b> Comparação do espectro de extinção do col 4A após adsorção da TC 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> com a soma dos espectros do col 4A e da TC 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> . Caminho óptico: 0,1cm.....	94
<b>Figura 46:</b> Espectros de extinção do col 4, do col 4 na presença de TC 1.10 <sup>-4</sup> e 1.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> . Espectro de absorção da TC 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> . Caminho óptico: 0,1cm.....	95
<b>Figura 47:</b> Geometria otimizada da TCH <sub>2</sub> <sup>±</sup> .....	96
<b>Figura 48:</b> Espectro Raman da TCH <sub>2</sub> <sup>±</sup> sólida $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ (A). Espectro Raman calculado da TCH <sub>2</sub> <sup>±</sup> isolada (B) .....	97
<b>Figura 49:</b> Geometria otimizada do complexo Ag <sub>2</sub> TCH <sub>2</sub> <sup>±</sup> .....	99
<b>Figura 50:</b> Espectro SERS da TCH <sub>2</sub> <sup>±</sup> 1,0.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> obtido utilizando colóide de prata(col 4A) e $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ (A). Espectro Raman calculado do complexo Ag <sub>2</sub> TCH <sub>2</sub> <sup>±</sup> . Espectro SERS com linha base ajustada para melhor visualização das bandas (B) .....	100
<b>Figura 51:</b> Geometria otimizada da BP interagindo com dois átomos de prata. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza da estrutura.....	110
<b>Figura 52:</b> Espectro Raman calculado do complexo Ag <sub>2</sub> BP <sup>-</sup> (A). Espectro Raman calculado do complexo Ag <sub>4</sub> BP <sup>-</sup> (B) .....	111
<b>Figura 53:</b> Espectros Raman calculados TCH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (A), TCH <sub>2</sub> <sup>±</sup> (B), TCH <sup>-</sup> (C) e TC <sup>2-</sup> (D) .....	114

**Figura 54:** Modelos otimizados das várias espécies de TC.  $\text{TCH}_3^+$ (A),  $\text{TCH}_2^\pm$ (B),  $\text{TCH}^-$ (C),  $\text{TC}^{2-}$ (D) e dois complexos  $\text{Ag}_2\text{TCH}_2^\pm$ (E) ..... 115

**Figura 55:** Espectros calculados para os modelos dos complexos de superfície  $\text{Ag}_2\text{TCH}_2^\pm$  .... 116

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Penicilinas utilizadas neste trabalho. Nome, estrutura e propriedades biológicas .....	34
<b>Tabela 2:</b> Aminoglicosídeos utilizados neste trabalho. Nome, estrutura e propriedades biológicas .....	36
Tabela 3: Proporções molares de AgNO <sub>3</sub> , NaBH <sub>4</sub> e Na <sub>3</sub> Cit utilizadas nas diferentes sínteses do col 1 .....	42
<b>Tabela 4:</b> Volumes de QUIT 0,2g.L <sup>-1</sup> e HAc adicionados ao col 2, volume final 2,0mL .....	43
<b>Tabela 5:</b> Proporções molares utilizadas na síntese do col 5 .....	44
<b>Tabela 6:</b> Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias ao AgNO <sub>3</sub> , AgNPs, QUIT e as AgNPs+QUIT .....	61
<b>Tabela 7:</b> Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias Gram – negativas aos antibióticos testados .....	62
<b>Tabela 8:</b> Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados .....	62
<b>Tabela 9:</b> Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-negativas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs na concentração sub-inibitória de 32µg.mL <sup>-1</sup> .....	63
<b>Tabela 10:</b> Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs na concentração sub-inibitória de 32µg.mL <sup>-1</sup> .....	63
<b>Tabela 11:</b> Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-negativas aos antibióticos testados em combinação com QUIT na concentração sub-inibitória 8µg.mL <sup>-1</sup> .....	64
<b>Tabela 12:</b> Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados em combinação com QUIT na concentração sub-inibitória 8µg.mL <sup>-1</sup> .....	64
<b>Tabela 13:</b> Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs + QUIT na concentração sub-inibitória 8µg.mL <sup>-1</sup> .....	65
<b>Tabela 14:</b> Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs + QUIT na concentração sub-inibitória 8µg.mL <sup>-1</sup> .....	65
<b>Tabela 15:</b> Atribuições vibracionais do espectro Raman da BPH obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada. Os números de onda estão em cm <sup>-1</sup> .....	72
<b>Tabela 16:</b> Atribuições vibracionais do espectro SERS da BP <sup>-</sup> obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula interagindo com 4 átomos de prata. Os números de onda estão em cm <sup>-1</sup> ..	76
<b>Tabela 17:</b> Atribuições vibracionais do espectro Raman da LVH obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada. Os números de onda estão em cm <sup>-1</sup> .....	82
<b>Tabela 18:</b> Atribuições vibracionais do espectro SERS da LVH <sup>±</sup> obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula interagindo com 2 átomos de prata. Os números de onda estão em cm <sup>-1</sup> ..	85

<b>Tabela 19:</b> Atribuições vibracionais do espectro Raman da RP obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada. Os números de onda estão em $\text{cm}^{-1}$ .....	89
<b>Tabela 20:</b> Atribuições vibracionais do espectro SERS da RP obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula interagindo com 6 átomos de prata. Os números de onda estão em $\text{cm}^{-1}$ ..	93
<b>Tabela 21:</b> Atribuições vibracionais do espectro Raman da $\text{TCH}_2^\pm$ obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada. Os números de onda estão em $\text{cm}^{-1}$ .....	98
<b>Tabela 22:</b> Atribuições vibracionais do espectro SERS da $\text{TCH}_2^\pm$ obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula interagindo com 2 átomos de prata. Os números de onda estão em $\text{cm}^{-1}$ .	101
<b>Tabela 23:</b> Atribuição vibracional tentativa das bandas Raman e SERS das espécies da BP, na região de estiramento C=O e C=C, obtidos dos espectros experimentais e teóricos dos dois modelos de complexo de superfície. Os números de onda estão em $\text{cm}^{-1}$ .....	112

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

$\omega$  - abano

$\delta$  - deformação angular

$\upsilon$  - estiramento

$\gamma$  - fora do plano

$\tau$  - torção

AA – ácido ascórbico

ac – ácido carboxílico

AC – amicacina

AgNPs – nanopartículas de prata

AP – ampicilina

as – assimétrico

AuNPs – nanopartículas de ouro

AuNPs – nanopartículas de ouro

BP – benzilpenicilina

c.a. – cerca de.

carb - carboxilato

CIM – concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

col – coloide

CV – cristal violeta

$DE_m$  – densidade eletrônica do metal

DFT – teoria de densidade funcional

$EF_m$  – energia do nível de Fermi do metal

$E_{TC}(A-M)$  – energia de transferência de carga adsorbato metal

$E_{TC}(M-A)$  – energia de transferência de carga metal adsorbato

FI – fator de intensificação

FT-Raman – espectrômetro Raman com transformada de Forrier

GT – gentamicina

HAc – ácido acético

HOMO – orbital molecular de maior energia ocupado

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

KCl – cloreto de potássio

LSPR – ressonância do plasmon de superfície localizado  
LUMO – orbital molecular de menor energia desocupado  
LV – levofloxacina  
MEV – microscopia eletrônica de varredura  
MP – meropenem  
MR – meropenem  
Na<sub>3</sub>Cit – citrato de sódio  
NaBH<sub>4</sub> – borohidreto de sódio  
Ni@Au – nanopartículas de níquel encobertas com nanopartículas de ouro  
NP – nanopartícula  
OC – oxacilina  
PAH – poli - hidrocloreto de anilina  
Ph – fenil  
PVA – polivinil álcool  
QUIT – quitosana  
RP – rifampicina  
SEM – microscopia eletrônica de varredura  
SERRS – espectroscopia Raman ressonante intensificada por superfície  
SERS – espectroscopia Raman Intensificada por Superfície  
sh – ombro  
sk - esqueleto  
TC – tetraciclina  
TEM – microscopia eletrônica de transmissão  
u – sombrinha  
UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora  
UV-VIS – espectroscopia de ultravioleta visível  
V<sub>ap</sub> – potencial aplicado  
VC – vancomicina  
V<sub>ox</sub> – potencial de oxidação  
V<sub>red</sub> – potencial de redução

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO .....	19
1.1.	ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	19
1.2.	PROPRIEDADES ÓPTICAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	20
1.3.	ESPECTROSCOPIA SERS .....	21
1.3.1.	Modelo Eletromagnético .....	21
1.3.2.	Modelo Químico .....	23
1.4.	MÉTODOS DE SÍNTESE DE AgNPs .....	25
1.5.	ESPECTROS SERS DE BIOMOLÉCULAS.....	27
1.6.	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	28
1.7.	APLICAÇÕES DE AgNPs EM SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	30
1.8.	QUITOSANA .....	32
1.9.	ANTIBIÓTICOS.....	33
1.9.1.	Penicilinas .....	33
1.9.2.	Carbapenêmicos .....	34
1.9.3.	Aminoglicosídeos.....	35
1.9.4.	Fluoroquinolonas.....	36
1.9.5.	Tetraciclina.....	37
1.9.6.	Rifampicina .....	38
1.9.7.	Vancomicina.....	39
2.	OBJETIVOS .....	40
2.1.	OBJETIVOS GERAIS .....	40
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	41
3.1.	REAGENTES E SOLVENTES .....	41
3.2.	INSTRUMENTAÇÃO.....	41
3.3.	SÍNTESES.....	41
3.3.1.	Síntese das AgNPs com diâmetros de <i>ca.</i> 10-30nm .....	42
3.3.1.a.	Síntese das AgNPs com diâmetros de <i>ca.</i> 10-30nm sem quitosana .....	42
3.3.1.b.	Síntese das AgNPs com diâmetros de <i>ca.</i> 10-30nm + quitosana .....	42
3.3.1.c.	Síntese das AgNPs com diâmetros de <i>ca.</i> 10-30nm + quitosana (2g L <sup>-1</sup> ) .....	43
3.3.2.	Síntese dos substratos SERS ativos, com AgNPs de diâmetro <i>ca.</i> 50-200 nm .....	43
3.3.2.a.	Síntese utilizando boroidreto e citrato.....	43

3.3.2.b. Síntese alternativa utilizando AA e Na <sub>3</sub> Cit .....	44
3.4. TESTES BIOLÓGICOS .....	45
3.5. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 4 NA PRESENÇA DOS ANTIBIÓTICOS .....	46
3.6. ESPECTROSCOPIA RAMAN E SERS .....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	48
4.1. ESPECTRO LSPR DO COLOIDE 1 .....	48
4.2. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 2 .....	49
4.3. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 3 .....	51
4.4. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 4 .....	54
4.5. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 5 .....	59
4.6. TESTES BIOLÓGICOS .....	61
4.7. ESPECTROS SERS E LSPR .....	66
4.7.1. Espectros Raman e SERS do cristal violeta .....	66
4.7.2. Espectros LSPR do col 4A na presença da benzilpenicilina .....	68
4.7.3. Espectro Raman e SERS da Benzilpenicilina .....	70
4.7.4. Espectros LSPR do col 4A na presença da levofloxacina .....	77
4.7.5. Espectros Raman e SERS da levofloxacina .....	80
4.7.6. Espectro LSPR do col 4A na presença do 2-mercaptoetanol .....	86
4.7.7. Espectros Raman e SERS da rifampicina .....	87
4.7.8. Espectros LSPR do col 4A na presença da tetraciclina .....	94
4.7.9. Espectros Raman e SERS da tetraciclina .....	96
5. CONCLUSÕES .....	102
6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	103
7. REFERÊNCIAS .....	104

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman assim como a espectroscopia do infravermelho dá informações sobre transições vibracionais de uma molécula. A espectroscopia Raman envolve o espalhamento de fótons de forma inelástica, enquanto a espectroscopia no infravermelho envolve a absorção de fótons em ressonância com as transições vibracionais. O fato dos espectros Raman e infravermelho muitas vezes serem diferentes é devido às regras de seleção que envolve as duas técnicas. A quantidade de bandas, suas frequências e intensidades relativas associadas a cada modo normal de vibração levam a diferentes padrões espectrais nos espectros Raman e no infravermelho. A atribuição dos mesmos fornece informações sobre a estrutura, a conformação e o ambiente químico da espécie molecular presente.

Classicamente a intensidade do espalhamento Raman pode ser escrita de acordo com a seguinte equação:

$$I_R = N I_0 \sigma_R dz \quad \text{Equação 1}$$

Onde N é o número de moléculas envolvidas no espalhamento Raman,  $I_0$  é a intensidade da radiação incidente,  $\sigma_R$  é a seção de choque Raman e dz é o caminho óptico do laser na amostra. (Mccreery, 2000) De acordo com equação 1 a intensidade do espalhamento Raman é proporcional à seção de choque. A magnitude de  $\sigma_R$  é relacionada com  $\delta\alpha/\delta Q$ , isto é, a variação da polarizabilidade com o deslocamento da coordenada Q em torno da posição de equilíbrio. Uma consequência dessa teoria é a variação da intensidade Raman,  $I_R$ , com a frequência da luz excitante e espalhada:

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

Onde  $\mu$  é uma constante,  $\nu_0$  é a frequência da radiação excitante,  $\nu_j$  é a frequência da radiação espalhada, j é o número quântico vibracional no estado j e  $\alpha_j$  é o momento de transição de um dipolo induzido. A equação 2 mostra que a intensidade Raman varia

com a quarta potência da frequência Raman espalhada e com a quarta potência da frequência da radiação excitante. O fator  $\nu^4$  é derivado do tratamento clássico do espalhamento de um dipolo induzido oscilante. Assim sendo, a seção de choque Raman  $\sigma_R$  está diretamente relacionada com  $\nu^4$  na equação 2, onde podemos inferir que  $I_R$  assume valores discretos de energia (McCreery, 2000).

Devido à baixa seção de choque Raman ( $10^{-30} \text{ cm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1} \text{ sr}^{-1}$ ) são necessárias aproximadamente  $10^8$  moléculas no volume investigado (Le Ru *et al.*, 2007) para obter sinal do espalhamento Raman. Neste contexto, efeitos de intensificação como o espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS) se apresenta como ferramenta poderosa para estudo e caracterização de monocamadas adsorvidas na superfície de metais como Ag, Au e Cu, uma vez que a intensificação do sinal Raman é da ordem de  $10^6$  vezes (Faria, Temperini e Sala, 1999).

## 1.2. PROPRIEDADES ÓPTICAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A ressonância do plasmon de superfície localizado (LSPR) está relacionada à estrutura eletrônica de uma NP que para os metais nobres ouro, prata e cobre, leva à absorção de fótons na região do visível ou do infravermelho próximo do espectro eletromagnético (Le Ru *et al.*, 2007). A oscilação do plasmon de superfície em um metal é a excitação coletiva de um gás formado pelos elétrons de condução que ao se propagar em estruturas nanométricas possui uma frequência que depende da geometria e do tamanho das nanopartículas (Aroca, 2006). O aumento no tamanho das nanopartículas resulta em um deslocamento da banda LSPR para maiores comprimentos de onda. A espectroscopia LSPR será aprofundada na seção 1.3 dessa dissertação, onde será discutido o mecanismo eletromagnético para o efeito SERS.

Para partículas com dimensões que se aproximam do comprimento de onda do fóton incidente, efeitos de espalhamento de Mie devem ser considerados. Esta teoria foi desenvolvida por Mie a partir das soluções das equações de Maxwell para partículas esféricas. Para partículas maiores que 50nm, a contribuição do espalhamento de Mie na região do vermelho e do infravermelho próximo, passa a ser relevante. (Sant'ana, Corio e Temperini, 2006) A extinção é definida como a soma da absorção e do espalhamento de luz pelas NPs metálicas.

### 1.3. ESPECTROSCOPIA SERS

O efeito SERS foi descoberto por Fleischmann *et al.*, quando obtiveram o espectro Raman da piridina adsorvida em eletrodo de prata com uma alta relação sinal-ruído. A intensificação do sinal Raman foi, inicialmente, associada ao aumento da área superficial do eletrodo, sendo devida ao tratamento eletroquímico aplicado, com vários ciclos de oxidação e redução em solução aquosa de KCl 0,1mol.L<sup>-1</sup>. (Fleischmann, Hendra e Mcquillan, 1974)

Em 1977, Jeanmaire *et al.* e Albrecht *et al.*, em dois trabalhos independentes, mostraram que o aumento da seção de choque da piridina adsorvida, após levar em conta o aumento da área real do eletrodo, era da ordem de 10<sup>6</sup> vezes. Portanto, a alta relação sinal/ruído dos espectros Raman da piridina não podia ser explicada apenas pelo aumento da área superficial do eletrodo que deveria ser da ordem de 10<sup>2</sup> vezes. Estava caracterizado, assim um novo fenômeno, que recebeu o nome de efeito SERS. (Albrecht e Creighton, 1977; Jeanmaire e Van Duyne, 1977)

A descoberta do efeito SERS gerou um grande esforço da comunidade científica no sentido de entender o fenômeno. Na década de 80, surgiram vários trabalhos teóricos para explicar o efeito SERS, que foi inicialmente observado em eletrodos ativados, suspensões coloidais e filmes finos. Estas teorias podem ser agrupadas em dois modelos: o eletromagnético e o químico ou molecular.

#### 1.3.1. Modelo Eletromagnético

O modelo eletromagnético envolve a excitação do plasmon de superfície pela radiação incidente. Esta excitação promove a intensificação do campo eletromagnético local na superfície da nanopartícula metálica, intensificando dessa forma os sinais Raman de moléculas adsorvidas sobre o metal. (Moskovits, 1985) A intensificação do sinal depende do substrato metálico utilizado, sendo o efeito SERS comumente observado nos metais Au, Ag e Cu. (Sant'ana, Corio e Temperini, 2006)

Em analogia à equação 1, a intensidade SERS para um determinado modo vibracional é dada por:

$$I_{SERS} = N(I\nu_L)|E(\nu_L)|^2 \cdot |E(\nu_s)|^2 \cdot \sigma_{ads}^R \quad \text{Equação 3}$$

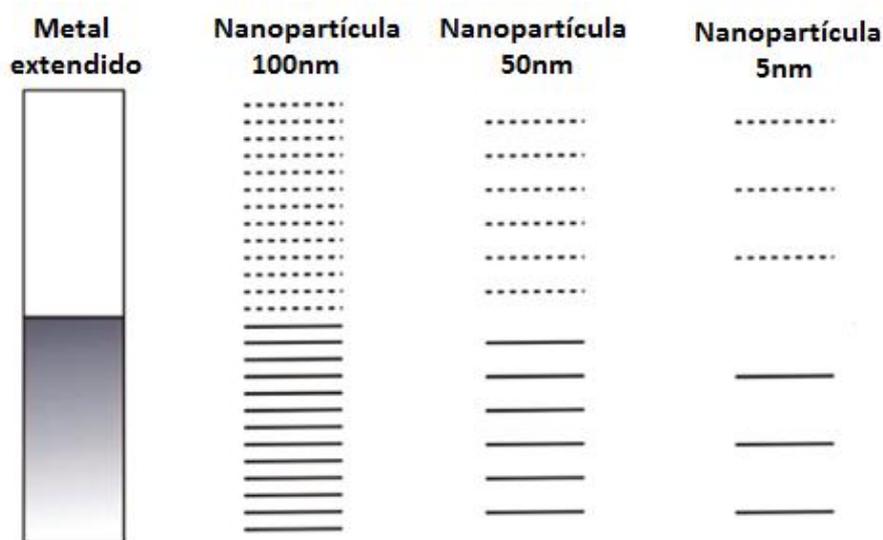
Onde  $\sigma_{ads}^R$  é a seção de choque Raman da molécula adsorvida,  $I_{\nu_L}$  é a intensidade da radiação incidente,  $|E(\nu_L)|$  é o campo elétrico da radiação incidente,  $|E(\nu_S)|$  é o campo elétrico da radiação espalhada e  $N$  é o número de moléculas envolvidas no espalhamento SERS (Kneipp *et al.*, 1999).

Dessa forma a intensidade SERS depende de  $|E|^4$  que é o principal fator pela intensificação SERS, uma vez que há a intensificação do campo elétrico local na superfície da nanopartícula (Kneipp *et al.*, 1999).

Para que o efeito SERS seja observado, de acordo com este modelo, superfícies rugosas, em nível nanométrico, são necessárias de modo que ocorra a ressonância entre a transição LSPR e as radiações excitante e espalhada. (Sant'ana, Corio e Temperini, 2006)

Uma das consequências do mecanismo eletromagnético, que a ressonância citada, é a forte dependência da intensificação SERS com a forma e com o tamanho das nanopartículas metálicas, pois estas propriedades modificam a posição da banda LSPR. Assim, a espectroscopia SERS está intrinsecamente ligada à nanociência, uma vez que o tamanho das estruturas metálicas com alto desempenho SERS é de poucas dezenas de nanômetros.

Morton *et al.*, mostraram a evolução da separação dos níveis de energia quando o número de átomos na superfície de uma nanopartícula aumenta. (Morton, Silverstein e Jensen, 2011) Segundo os autores, o aumento do número de átomos, promove uma combinação adicional dos orbitais atômicos do metal, ocorrendo à formação de bandas de energia. Quanto maior o número de átomos na nanopartícula, menos espaçadas estão as bandas de valência e de condução. No metal estendido, essas bandas de energia formam uma estrutura contínua sem separação entre as bandas. A transição LSPR envolve transferência eletrônica entre a banda de valência de maior energia ocupada para a banda de condução de menor energia desocupada. A Figura 1 mostra a evolução na separação entre as bandas de energia com o aumento no número de átomos na superfície de uma nanopartículas.



**Figura 1:** Evolução da separação da banda de valência e da banda de condução com o aumento do número de átomos de uma nanopartícula (NP). (Morton, Silverstein e Jensen, 2011)

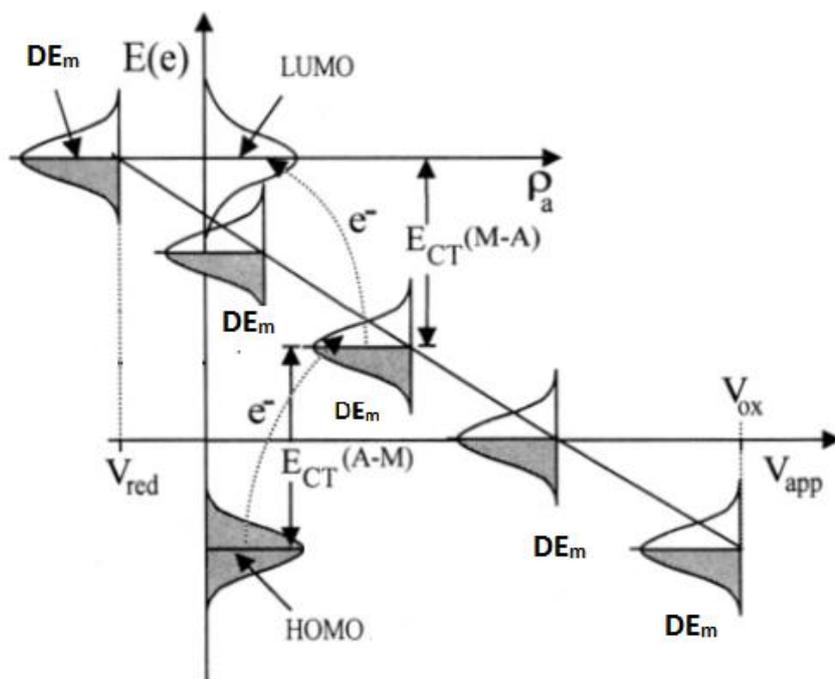
A contribuição apenas da intensificação eletromagnética é, em média, da ordem de  $10^4$  vezes em relação ao efeito Raman normal. (Natan, 2006) Segundo este modelo, o espectro observado é igual ao espectro Raman convencional, uma vez que não é necessária uma interação forte com a superfície. Contudo, Kneipp *et al.*, reportaram pela primeira vez a detecção de uma única molécula através do efeito SERS. (Kneipp *et al.*, 1997) Nesse caso, o fator de intensificação Raman pode chegar à *ca.*  $10^{14}$ , sendo a intensificação observada devido à existência de “hot spots”. Estes são sítios, formados por pares de nanopartículas, alinhadas com o campo elétrico externo, com a molécula adsorvida na região onde a intensificação do campo é gigante, seriam os principais responsáveis pelas intensificações do campo local a ponto de permitir a detecção de uma única molécula. (Ru e Etchegoin, 2008)

### 1.3.2. Modelo Químico

O mecanismo químico do efeito SERS é assim denominado devido a sua dependência com relação à estrutura eletrônica da molécula adsorvida. Neste caso, ocorre a formação de um complexo de superfície, onde dependendo da proximidade entre os níveis de energia dos orbitais HOMO (orbital molecular de mais alta energia ocupado) e LUMO (orbital molecular de menor energia desocupado) da molécula e do

nível de Fermi do metal, pode ocorrer interações por transferência de carga. (Corio *et al.*, 1999)

Existem vários trabalhos na literatura que citam o mecanismo de transferência de carga para a adsorção molecular em várias superfícies como, por exemplo, em coloides metálicos, mas a observação do mecanismo químico do efeito SERS em sistemas eletroquímicos permitiu melhor observar este fenômeno. Assim, o mecanismo de transferência de carga, pode ser esquematizado em um sistema eletroquímico, onde a superfície metálica é o eletrodo de trabalho, considerando os valores relativos do nível de Fermi do metal e dos níveis HOMO e LUMO do adsorbato. A Figura 2 mostra a variação da energia dos estados eletrônicos do metal, com a aplicação de potencial, em relação às energias dos orbitais HOMO e LUMO do adsorbato.



**Figura 2:** Variação do nível de Fermi do metal em função do potencial aplicado no eletrodo e em relação às energias do HOMO e LUMO do adsorbato.  $E_{F_m}$ =energia do nível de Fermi do metal,  $DE_m$ =densidade eletrônica do metal,  $V_{ap}$ = potencial aplicado,  $V_{ox}$ = potencial de oxidação do adsorbato,  $V_{red}$ =potencial de redução do adsorbato,  $E_{CT}(M-A)$  = energia de transferência de carga metal adsorbato,  $E_{CT}(A-M)$  = energia de transferência de carga adsorbato metal. (Rubim *et al.*, 1995)

Considerando-se este diagrama, podem ocorrer transferências de carga do HOMO da molécula para o nível de Fermi do metal ou, o inverso, do nível de Fermi do metal

para o LUMO da molécula induzidos pela radiação excitante, cujos fótons estão em ressonância com a transição eletrônica de transferência de carga citada. Além disso, a variação do potencial da superfície metálica pode modificar a energia dos estados eletrônicos do metal e, com isso a energia da transferência de carga também se altera. Ao se aplicar um potencial onde  $V_{ap}=V_{ox}$  ocorre à oxidação do adsorbato. Do mesmo modo, quando  $V_{ap}=V_{red}$  ocorre à redução do adsorbato. A partir dessas considerações é possível desenvolver um modelo em que a transferência de carga seja monitorada pela radiação excitante. Esse modelo prevê a forte dependência do máximo de intensidade SERS com a variação do potencial aplicado ao eletrodo.

A intensificação química segundo este modelo é da ordem de  $10^2$ . Segundo este modelo, o espectro Raman da espécie adsorvida pode divergir do espectro Raman normal, uma vez que a interação entre os estados eletrônicos do metal e da molécula adsorvida leva a uma nova espécie. Por isso, pode-se considerar que o efeito químico é um mecanismo de curto alcance.

#### 1.4. MÉTODOS DE SÍNTESE DE AgNPs

AgNPs podem ser sintetizadas através de métodos convencionais de síntese, no qual o modo de preparação se baseia, na redução de um sal metálico, chamado de precursor, na presença de um agente redutor, muitas vezes boroidreto de sódio ( $NaBH_4$ ) ou citrato de sódio ( $Na_3Cit$ ).

A aplicação de AgNPs de prata em sistemas biológicos é uma área emergente na nanociência. AgNPs apresentam elevada ação antibacteriana (Fernández *et al.*, 2008) e vários métodos com diferentes rotas de síntese são utilizados para a alta performance na ação biológica. Atualmente, são citados na literatura os métodos de sínteses verdes, que envolvem a seleção de um solvente, meio redutor e substâncias que não prejudiquem o meio ambiente nas diferentes rotas sintéticas. Dentre esses métodos destacam-se:

- **Método do polissacarídeo**

Nesse método as AgNPs são preparadas em água utilizando um polissacarídeo como redutor e estabilizador. Na literatura destacam-se dois trabalhos: o trabalho de Vigneshwaran *et al.* que mostra a redução de uma solução de  $\text{AgNO}_3$  e amido quando, em autoclave a 15psi e  $121^\circ\text{C}$ , formam uma suspensão de AgNPs estabilizadas com a amilose. (Vigneshwaran *et al.*, 2006) Outro trabalho mostra a redução do  $\text{AgNO}_3$  por heparina à  $70^\circ\text{C}$ , onde os autores concluem, através das imagens de microscopia eletrônica de transmissão, que o aumento na concentração de heparina produz AgNPs de variadas formas e tamanho. (Huang e Yang, 2004)

- **Método de irradiação**

Nesse método a irradiação de uma solução de  $\text{AgNO}_3$  com radiação eletromagnética de frequência pré-estabelecida, utilizando-se um agente redutor, promove a formação de AgNPs com elevado controle na distribuição de tamanhos. (Abid *et al.*, 2002)

- **Método de Tollens**

Este método envolve a redução de  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$  por um aldeído, como por exemplo a glicose. (Kvitek *et al.*, 2005) Neste trabalho, variou-se a concentração de  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$   $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$  a  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , modificando dessa forma o tamanho das AgNPs. Os autores concluíram que a concentração  $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$  é responsável pela formação de AgNPs com menor distribuição de tamanhos. Da mesma forma, em outro trabalho, AgNPs de tamanhos controlados foram sintetizadas pela redução  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$  com os monossacarídeos (glicose e galactose) e os dissacarídeos (maltose e galactose). A variação na concentração de  $\text{Ag}[\text{NH}_3]_2^+$  de  $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$  a  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , resultou em partículas com o tamanho médio 25-400nm. Os autores concluíram, que as diferenças nas estruturas dos monossacarídeos e dos dissacarídeos, influenciam no tamanho das partículas em suspensão aquosa, que são menores para os dissacarídeos quando comparados com as obtidas para os monossacarídeos. (PanáčEk *et al.*, 2006)

- **AgNPs e macromoléculas**

A incorporação de polímeros nas AgNPs mostra-se como uma emergente área para a utilização dessas nanopartículas em sistemas biológicos. Polímeros são excelentes agentes estabilizadores de AgNPs, (Mbhele *et al.*, 2003) e dependendo do polímero

utilizado este pode interagir com as AgNPs intensificando a ação biológica (Kvitek *et al.*, 2008). Mbhele *et al.* mostraram as mudanças nas propriedades térmicas e mecânicas do PVA (polivinil álcool) depois da incorporação do polímero em suspensão de AgNPs previamente preparada. (Mbhele *et al.*, 2003) Além desses, vários outros métodos de síntese são relatados na literatura, os quais envolvem redução do sal precursor com proteínas, enzimas, entre outros (Gardea-Torresdey *et al.*, 2003; Collera-Zúñiga, García Jiménez e Meléndez Gordillo, 2005). A utilização destes estabilizantes influencia na obtenção dos espectros SERS dos adsorbatos, uma vez que a utilização de polímeros pode colaborar para a perda de intensidade em experimentos SERS, bem como a não observação do espectro de interesse. Esse fato surge da estabilização das AgNPs e da troca de cargas na superfície das mesmas, bem como a competição pela superfície entre o estabilizante e o adsorbato. Nesse sentido, sínteses que envolvem métodos convencionais de preparação de AgNPs, no qual há redução de  $\text{AgNO}_3$  com  $\text{NaBH}_4$  ou  $\text{Na}_3\text{Cit}$ , são os mais utilizados para a obtenção dos espectros SERS dos adsorbatos, pois esses redutores promovem também a estabilização das AgNPs por carga negativa do ânion borato ou citrato, respectivamente, e são facilmente trocadas pelo adsorbato de interesse.

## 1.5. ESPECTROS SERS DE BIOMOLÉCULAS

Howes *et al.* estudaram os espectros SERRS (espalhamento Raman ressonante intensificado por superfície) dos antibióticos rifampicina, rifamicina e rifaximina utilizando colóide de prata e variando o pH da suspensão para os três antibióticos. (Howes *et al.*, 2006) O espectro SERRS da rifampicina foi obtido somente para  $\text{pH} < 7,7$ , enquanto a rifamicina mostrou melhor desempenho SERRS para  $\text{pH} < 7$ , propondo assim, a alta dependência da espécie adsorvida com o pH do meio. Os autores propuseram ainda, que a mudança no grupo cromóforo dos antibióticos estudados influenciou fortemente nos espectros SERRS da rifampicina, rifamicina e rifamicin. O efeito SERRS é observado quando a radiação excitante está em ressonância com a transição eletrônica da molécula investigada e com o substrato metálico utilizado.

Iliescu *et al.* mostraram o estudo da adsorção da benzilpenicilina sobre colóide de prata. (Iliescu, Baia e Pavel, 2006) Os autores calcularam as frequências vibracionais da molécula livre baseado em cálculos DFT (teoria de densidade funcional), e a partir das atribuições dos espectros SERS chegaram à conclusão que a benzilpenicilina adsorve

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

Li *et al.* estudaram o espectro SERS da rodamina 6G e da tetraciclina com nanoestruturas fabricadas utilizando um núcleo de níquel e uma casca de ouro (Ni@Au). (Li *et al.*, 2011) Os autores obtiveram o espectro SERS da rodamina 6G na concentração  $10^{-15}$  mol.L<sup>-1</sup> e da tetraciclina na concentração  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> e radiação excitante em 785nm. Dessa forma, os autores concluíram que a detecção de tetraciclina em baixas concentrações pode ser utilizada para a detecção de tetraciclina em leite e alimentos de origem animal.

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

Kahraman *et al.* mostraram que a técnica de cobertura camada por camada de AgNPs e de AuNPs utilizando poli-hidrocloreto de anilina (PAH) é eficiente para a detecção de uma única célula bacteriana. (Kahraman *et al.*, 2009) Os autores estudaram a adsorção das AgNPs e das AuNPs sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mostrando que a cobertura com o polieletrólito PAH é eficaz para diferenciar as composições da parede celular da bactéria Gram-positiva *Stapylococcus conhii* e Gram-negativa *Escherichia coli*.

## 1.6. RESISTÊNCIA BACTERIANA

O descobrimento dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária. Eles são importantes na redução da mortalidade de doenças infecciosas (Manie *et al.*, 1998).

Os antibióticos podem ser classificados como bacteriostáticos quando agem contra micro-organismos inibindo seu crescimento e duplicação; ou como bactericidas quando agem com efeito letal sobre os micro-organismos sensíveis.

De acordo com a técnica de Gram as bactérias podem ser classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas. As bactérias que são coradas pelo método são classificadas como Gram-positivas, já as não coradas pelo método são classificadas como Gram-negativas. A coloração ou não das bactérias é dependente das diferenças nas estruturas, composição química, permeabilidade celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade (Pelczar, Reid e Chan, 1997).

O componente da parede celular que determina se a bactéria é Gram-positiva ou Gram-negativa é o peptidoglicano. Nas bactérias Gram-negativas, o peptidoglicano constitui uma fração menor do total da parede celular, comparando-se com o que ocorre nas bactérias Gram-positivas (Pelczar, Reid e Chan, 1997).

A partir de 1950, quando os antibióticos passaram a ser amplamente utilizados, iniciou-se o fenômeno da resistência bacteriana. Desde então, o problema da resistência aos antibióticos passou a representar importância considerável em saúde pública. (Rapini *et al.*, 2004). Na literatura existem inúmeros trabalhos que citam os mecanismos de resistência a antibióticos. (Chopra e Roberts, 2001), (Pereira-Maia *et al.*, 2010), (Costerton, Stewart e Greenberg, 1999), (Cohen, Chang e Hsu, 1972), (Neu, 1992)

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

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

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

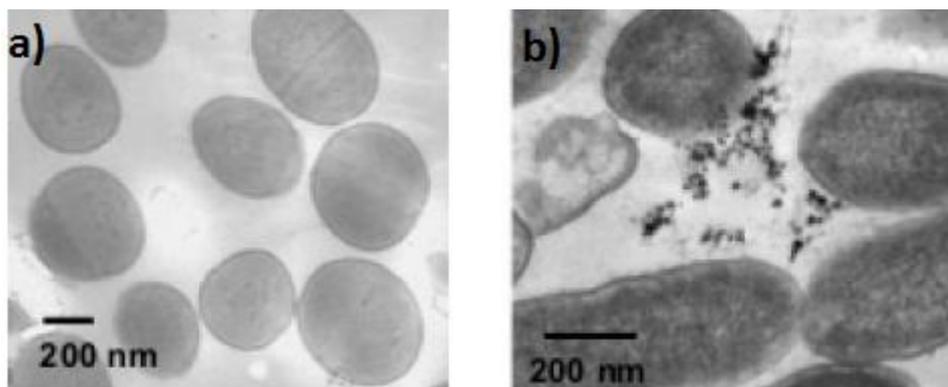
## 1.7. APLICAÇÕES DE AgNPs EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

AgNPs são conhecidas e amplamente estudadas por possuírem ação antibacteriana. (Alt *et al.*, 2004), (Kim *et al.*, 2007), (Li *et al.*, 2008), (Espinosa-Cristóbal *et al.*, 2009), (Cao *et al.*, 2010), (García-Barrasa, López-De-Luzuriaga e Monge, 2011) Na literatura, vários autores citam os diversos usos e aplicações das AgNPs. Dentre estes podemos destacar:

- O uso de AgNPs para o revestimento de cateteres de plástico prevenindo assim à formação de biofilme pelas bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Staphylococci* e *Pseudomonas aeruginosa* (Roe *et al.*, 2008);
- A ação antibacteriana de AgNPs quando essas são misturadas a tintas, sendo eficazes na ação antibacteriana para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Kumar *et al.*, 2008).
- Coloides de prata podem ser utilizados em filtros de água para a remoção de 97,8-100% de *Escherichia coli* (Oyanedel-Craver e Smith, 2007);
- A ação citoprotetora das AgNPs contra células infectadas com o vírus HIV (Sun *et al.*, 2005);

Portanto, AgNPs têm seu potencial uso como agente antisséptico, sendo eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Neste trabalho, a mistura de antibióticos e AgNps mostrou um efeito de sinergia quando houve à associação dos dois. Dessa forma, a incorporação de antibióticos nas AgNPs pode ser uma área emergente que ajude, futuramente, a conter a resistência às bactérias.

Várias outras pesquisas são elaboradas no sentido de compreender os mecanismos de ação das AgNPs. Estas podem aderir na membrana celular das bactérias destruindo a permeabilidade e as funções respiratórias da célula como mostra o trabalho de (Morones *et al.*, 2005). A Figura 3 mostra a imagem TEM (*Microscopia eletrônica de transmissão*) da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* sem a interação e interagindo com as AgNPs.



**Figura 3:** Imagem TEM da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* sem interação com AgNPs(a) e com interação com as AgNPs(b) (Morones *et al.*, 2005)

Nestas interações há forte dependência com a forma e o tamanho das AgNPs. Nanopartículas com tamanhos entre 5-10nm possuem uma atividade antibacteriana maior quando comparadas com as AgNPs com tamanhos entre 30-100nm. (García-Barrasa, López-De-Luzuriaga e Monge, 2011) Isto está relacionado ao fato de que AgNPs de menores tamanhos possuem uma área superficial maior para o contato com as células bacterianas (Kvitek *et al.*, 2011).

É possível também que às AgNPs penetrem dentro da célula bacteriana pela formação de poros na membrana celular. A Figura 4 mostra a imagem TEM da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* após interação com as AgNPs, essas são fagocitadas pela célula bacteriana devido à formação de poros na mesma (Morones *et al.*, 2005).

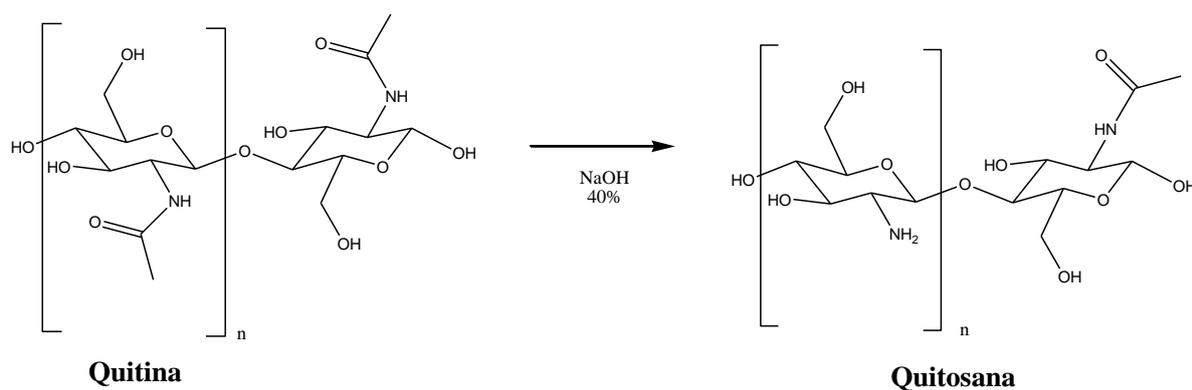


**Figura 4:** Imagem TEM da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* com interação com as AgNPs penetrando no interior da célula bacteriana (Morones *et al.*, 2005)

## 1.8. QUITOSANA

A quitina é um polímero que está presente nos exoesqueletos de alguns invertebrados (insetos, crustáceos, moluscos) e das paredes celulares de alguns fungos e algas. Por ser extraída de exoesqueletos de crustáceos e moluscos, a quitina pode ser obtida dos resíduos da indústria pesqueira (Ravi Kumar, 2000).

A quitosana (QUIT) é um polissacarídeo derivado da desacetilação parcial da quitina. A quitosana é composta predominantemente por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . A completa desacetilação da quitina é raramente realizada por serem necessárias muitas reações consecutivas, que favorecem sua progressiva despolimerização. Na prática, é a solubilidade que permite a distinção entre a QUIT e a quitina, sendo a quitina insolúvel e a quitosana solúvel em meio ácido dependendo do grau de desacetilação (Campana-Filho *et al.*, 2007). A Figura 5 mostra a obtenção da quitosana a partir da desacetilação da quitina.



**Figura 5:** Processo de obtenção da quitosana a partir da desacetilação alcalina da quitina

A quitosana é um polímero muito versátil com aplicações nas indústrias cosmética, alimentícia e como agente de floculação no tratamento de água. Além disso, sua alta capacidade de interagir com proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos, faz com que a quitosana seja aplicada em diversos sistemas que são voltados para a detecção e análise dessas substâncias. Exibe alta atividade antibacteriana sendo também atóxica, biodegradável e biocompatível. Sua ação antibacteriana é associada aos grupos amino pertencentes à sua estrutura (Pillai, Paul e Sharma, 2009) e

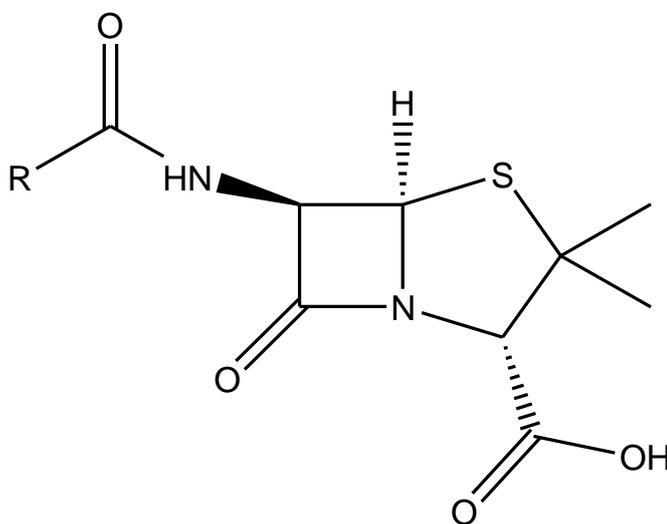
dependendo do grau de desacetilização possibilita adequações nas propriedades biológicas de acordo com a aplicação desejada (Kim *et al.*, 2008).

Neste trabalho, incorporou-se quitosana nas AgNps com a finalidade de estabilização das AgNps e intensificação do efeito antibacteriano por sinergia, uma vez que AgNps e quitosana apresentam ação antibacteriana.

## 1.9. ANTIBIÓTICOS

### 1.9.1. Penicilinas

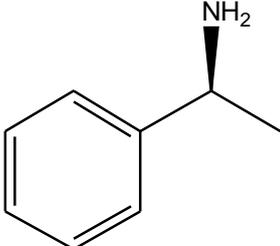
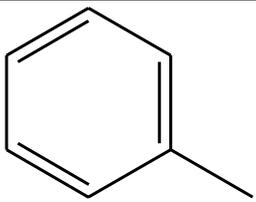
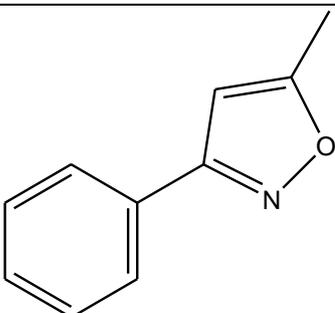
As penicilinas correspondem a uma classe de antibióticos constituídos de um núcleo principal formado por um anel tiazolidínico conectado a outro anel  $\beta$ -lactâmico, no qual está ligada uma cadeia lateral (Spratt, 1975). Essa cadeia é responsável pela maioria das propriedades farmacológicas e antibacterianas das penicilinas. Sua ação antibacteriana é resultante da inibição da enzima transpeptidase, que está envolvida, na última etapa da síntese da estrutura da parede celular da bactéria (Tipper e Strominger, 1965). A fórmula estrutural geral das penicilinas está representada na Figura 6:



**Figura 6:** Fórmula estrutural geral das penicilinas

As penicilinas utilizadas neste trabalho foram a amicacina, benzilpenicilina ou penicilina G e oxacilina. Suas fórmulas estruturais, propriedades e atividade biológica estão relacionadas na Tabela 1:

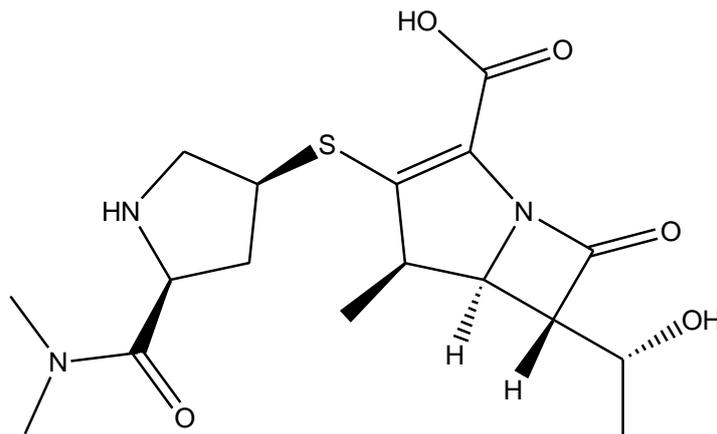
**Tabela 1:** Penicilinas utilizadas neste trabalho. Nome, estrutura e propriedades biológicas

Nome	Estrutura química	Propriedades
	R=	
Ampicilina		Possui ampla ação contra as bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>Neisseriae meningites</i> (Lacy et al., 1999).
Benzilpenicilina Penicilina G		Possui ação contra bactérias Gram – positivas: <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Actinomyces bovis</i> , <i>Streptobacillus moniliformis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Leptospira</i> (Iliescu, Baia e Pavel, 2006).
Oxacilina		Possui ampla ação contra a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (Mcdougal et al., 2003)

### 1.9.2. Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com ampla ação desenvolvida para atender as necessidades médicas na terapia de doenças infecciosas. Esses agem do mesmo modo que os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, inibindo a síntese da parede bacteriana pela ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas. Estes antibióticos atuam na parede celular bloqueando a transpeptidação, ligação covalente das cadeias lineares

de fragmentos precursores do peptidoglicano. Uma diferença dos antibióticos carbapenêmicos dos demais  $\beta$ -lactâmicos está no fato de as carbapenemas apresentarem uma considerável estabilidade frente a betalactamases que são enzimas produzidas por algumas bactérias responsáveis por resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Menezes *et al.*, 2007). O antibiótico da classe dos carbapenêmicos utilizado neste trabalho foi o meropenem. A fórmula estrutural desse antibiótico está representada na Figura 7:



**Figura 7:** Fórmula estrutural do meropenem

### 1.9.3. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são moléculas formadas por um anel aminociclitol ligados a um ou mais amino açúcar através de ligação glicosídica. Os aminoglicosídeos são transportados na membrana plasmática em um processo dependente de oxigênio. Estes se difundem através dos canais aquosos formados por proteínas do tipo porina na membrana externa das bactérias Gram – negativas e, desse modo, penetram no espaço periplasmático (Oliveira, Canedo e Rossato, 2002). Seu efeito colateral mais importante é a ototoxicidade, representando potencial gravidade para as funções auditivas e vestibulares (Baggio, Silveira e Hyppolito, 2009).

Os aminoglicosídeos utilizados neste trabalho foram a gentamicina e a amicacina. A fórmula estrutural da gentamicina e amicacina bem como suas propriedades são apresentadas na Tabela 2:

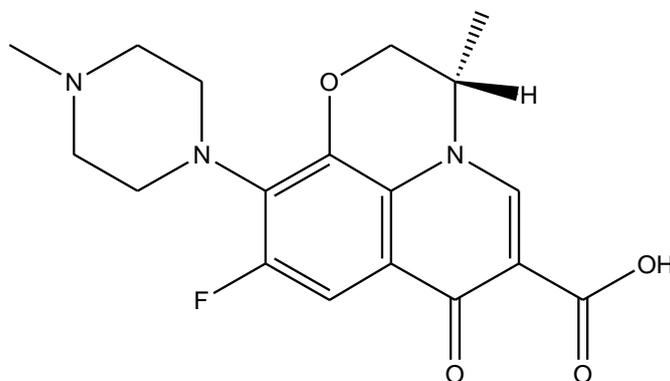
**Tabela 2:** Aminoglicosídeos utilizados neste trabalho. Nome, estrutura e propriedades biológicas

Nome	Estrutura	Propriedades
Amicacina		<p>A amicacina é um aminoglicosídeo semi-sintético derivado da kanamicina, ativo contra a maioria das espécies microbianas resistentes à gentamicina e kanamicina. Tem ampla ação contra a bactéria <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Oliveira, Canedo e Rossato, 2002).</p>
Gentamicina		<p>A gentamicina é um antibiótico de ação bactericida que atua principalmente nas infecções causadas por bacilos Gram-negativos (Baggio, Silveira e Hyppolito, 2009).</p>

#### 1.9.4. Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas combatem as infecções bacterianas através da inibição da DNA girase e topoisomerase, enzimas essenciais envolvidas na replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano. (Qian *et al.*, 2012) A habilidade de penetração em diferentes espécies de bactérias, bem como de se ligar à DNA girase, são processos determinantes na ação de uma fluoroquinolona. Nos últimos 40 anos, um grande número

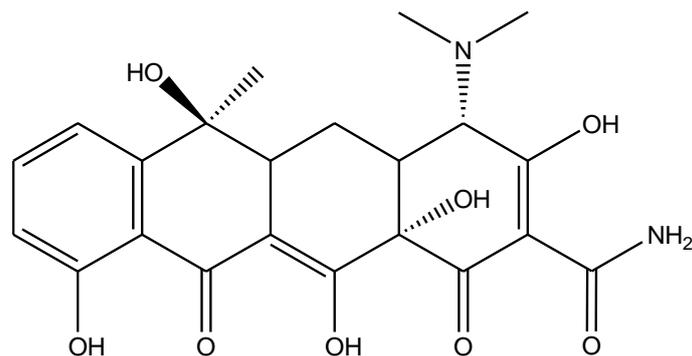
de derivados fluoroquinolônicos foi sintetizado. Estes fármacos são classificados em 4 gerações, de acordo com a ordem cronológica de surgimento. (Qian *et al.*, 2012) Neste trabalho utilizou-se a levofloxacin, que pode ser considerada uma fluoroquinolona de terceira geração. O levofloxacin é o isômero D,L – do ofloxacin racemato. O isômero L é significativamente mais ativo que o isômero D e é o componente ativo do ofloxacin. O levofloxacin está aprovado para o tratamento de indivíduos com pneumonia crônica, exacerbações bacterianas agudas de bronquite crônica, pielonefrite crônica e infecções complicadas do trato urinário (Gales *et al.*, 1997). A fórmula estrutural desse antibiótico está representada na Figura 8:



**Figura 8:** Fórmula estrutural do levofloxacin

### 1.9.5. Tetraciclina

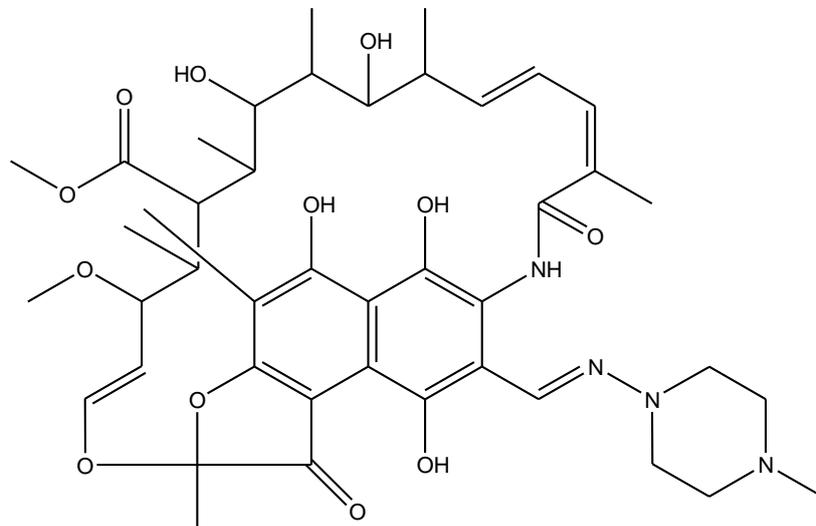
As tetraciclinas agem por ligação a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo, a adição de aminoácidos e, conseqüentemente, impedindo a síntese proteica. Em bactérias sensíveis, as tetraciclinas ligam-se ao ribossomo e mudam sua conformação padrão interrompendo a síntese proteica. Tetraciclinas possuem diversas propriedades favoráveis, tais como baixo custo, baixa toxicidade, podendo se administradas por via oral. Possuem ampla ação contra micobactérias como *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium leprae*, além de apresentar ação contra várias outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Pereira-Maia *et al.*, 2010). A fórmula estrutural da tetraciclina está representada na Figura 9:



**Figura 9:** Fórmula estrutural da tetraciclina

### 1.9.6. Rifampicina

A rifampicina atua inibindo a RNA - polimerase DNA – dependente de micobactérias e de outros microorganismos, através da formação de um complexo fármaco-enzima estável, resultando em supressão do início da formação da cadeia na síntese de RNA. É indicada para o tratamento da tuberculose com a associação dos fármacos isoniazida e pirazinamida por um período de até 6 meses (Lees *et al.*, 1971).



**Figura 10:** Fórmula estrutural da rifampicina



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliação da atividade antibacteriana de nanopartículas de prata associadas com quitosana e antibióticos e investigação das propriedades químicas de alguns dos antibióticos com a superfície de prata pelo estudo da adsorção molecular por espectroscopia SERS e LSPR.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese das AgNPs, com diâmetros de *ca.* 10-30nm (área superficial grande);
- Síntese das AgNPs com diâmetros de *ca.* 10-30nm + Quitosana;
- Síntese das AgNPs com diâmetros de *ca.* 10-30nm+Quitosana+antibióticos;
- Avaliação biológica dos antibióticos LV, TC, RP, BP, MP, AP, AC, GT, VC e OC, utilizando as misturas acima citadas;
- Síntese dos substratos SERS ativos (AgNPs com diâmetro de *ca.* 50-200 nm, com banda LSPR em ressonância com a radiação excitante de comprimento de onda 1064 nm);
- Obtenção dos espectros SERS e LSPR dos antibióticos TC, RP, LV e BP;
- Obtenção das micrografias por microscopia eletrônica de varredura das AgNPs obtidas com diâmetros menores (para os testes biológicos) e diâmetros maiores (para espectroscopia SERS).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. REAGENTES E SOLVENTES

Todos os reagentes utilizados  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{Cit}$ , nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), (QUIT), cristal violeta (CV), ácido acético (HAc), LV, TC, RP, BP, MP, AP, AC, GT, VC e OC foram obtidos da Sigma Aldrich. A água utilizada no preparo das soluções foi água deionizada Milli-Q, 18,2M $\Omega$ cm. Toda a vidraria foi limpa em solução de água régia (3:1; HCl:HNO<sub>3</sub>) e enxaguada abundantemente com água deionizada.

#### 3.2. INSTRUMENTAÇÃO

- Espectroscopia Raman e espectroscopia SERS

As medidas SERS e Raman foram feitas utilizando-se o espectrômetro FT-Raman da Bruker com radiação excitante em 1064nm modelo RFS-100 equipado com detector de germânio e resfriado com nitrogênio líquido. Medidas adicionais foram feitas utilizando espectrômetro micro-Raman HORIBA, modelo XPlora, com radiação excitante em 532, 638, 785nm (lasers de estado sólido) e detector CCD (*charge-coupled device*).

- Espectroscopia de extinção e de absorção

Os espectros de extinção das AgNPs e de absorção dos adsorbatos LV, TC e BP foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-PC 1800, com lâmpada de tungstênio (infravermelho próximo e visível) e de deutério (ultravioleta), utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1cm e 1cm.

- Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas utilizando-se microscópio eletrônico de varredura, Field Emission Gun, da FEI, mod.: Magellan. Este aparelho pertence a Divisão de Metrologia de Materiais, Instituto Nacional de metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). As amostras foram preparadas gotejando a suspensão coloidal sobre silício e secando sob vácuo.

#### 3.3. SÍNTESES

As AgNPs sintetizadas neste trabalho foram obtidas através da redução  $\text{AgNO}_3$  por  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{Na}_3\text{Cit}$ . Para tanto, diferentes rotas de síntese foram utilizadas com a finalidade de obter AgNPs pequenas o suficiente para maximizar o efeito antibacteriano,

e grandes o suficiente para que essas tenham desempenho SERS com as radiações excitantes em 532, 638 e 1064nm. Uma síntese alternativa utilizada envolveu a redução  $\text{AgNO}_3$  por ácido ascórbico (AA) e  $\text{Na}_3\text{Cit}$ . As AgNPs utilizadas nos testes biológicos devem ter concentração inicial de  $\text{Ag}^0 = 0,2\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{QUIT} = 0,2\text{g.L}^{-1}$ , pois estas devem seguir as normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) utilizadas nos testes biológicos.

### 3.3.1. Síntese das AgNPs com diâmetros de ca. 10-30nm

#### 3.3.1.a. Síntese das AgNPs com diâmetros de ca. 10-30nm sem quitosana

Síntese do Col 1: O col 1 foi obtido de acordo com a modificação da síntese original do artigo descrito por (Grabar *et al.*, 1996). Para tanto, em 50,0mL de uma solução de  $\text{AgNO}_3$   $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  foi adicionado 1,0mL de solução de citrato de sódio  $1,6 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  e gotejada à temperatura ambiente 0,5mL de uma solução de  $\text{NaBH}_4$   $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Foi feito ainda um estudo da reprodutibilidade do col 1 em diferentes sínteses variando-se ou não a concentração inicial de  $\text{AgNO}_3$ . A Tabela 3 mostra as proporções molares de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{Na}_3\text{Cit}$ , utilizadas nas diferentes sínteses do col 1. As concentrações de  $\text{AgNO}_3$  no col 1A é de  $2,54 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e no col 1B é de  $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

**Tabela 3:** Proporções molares de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{Na}_3\text{Cit}$  utilizadas nas diferentes sínteses do col 1

	$\text{AgNO}_3$	$\text{NaBH}_4$	$\text{Na}_3\text{Cit}$
Col 1	1	0,1	2
Col 1A	1	0,9	13
Col 1B	1	0,08	1,4

#### 3.3.1.b. Síntese das AgNPs com diâmetros de ca. 10-30nm + quitosana

Síntese do col 2: o col 1B foi utilizado para incorporar-se QUIT. Este conjunto de síntese foi denominado col 2. O col 2 foi obtido pela redução de 50mL de  $\text{AgNO}_3$   $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  por 1,0mL de  $\text{Na}_3\text{Cit}$   $1,6 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  e gotejamento de 0,5mL  $\text{NaBH}_4$   $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  à temperatura ambiente. Uma solução estoque de QUIT  $0,2\text{g.L}^{-1}$  foi adicionado às AgNPs variando-se o volume de solução de QUIT bem como o pH do

meio. A QUIT é solúvel em meio ácido ocorrendo à coagulação da QUIT quando o pH do colóide está básico ou neutro (Saini *et al.*, 2011). A Tabela a seguir mostra os volumes de QUIT e de solução de HAc  $1.10^{-1} \text{mol.L}^{-1}$  adicionados ao col 2:

**Tabela 4:** Volumes de QUIT  $0,2\text{g.L}^{-1}$  e HAc adicionados ao col 2, volume final 2,0mL

	Volumes de solução HAc	Volume da solução QUIT
	$1.10^{-1} \text{mol.L}^{-1}$ em $\mu\text{L}$	$0,2\text{g.L}^{-1}$ em $\mu\text{L}$
Col 2 (Col 1 B)	0	0
Col 2A	0	100
Col 2B	30	100
Col 2C	30	50
Col 2D	40	150
Col 2E	30	200
Col 2F	40	200
Col 2G	50	400
Col 2H	100	150
Col 2I	30	25

### 3.3.1.c. Síntese das AgNPs com diâmetros de *ca.* 10-30nm + quitosana ( $2\text{g L}^{-1}$ )

Síntese do col 3: o col 3 foi preparado conforme metodologia utilizada para o preparo do col 2, mas variou-se a concentração da solução de quitosana para  $2\text{g.L}^{-1}$ . No dia posterior à síntese foi adicionado  $500\mu\text{L}$  de HAc glacial para a solubilização da QUIT que tinha coagulado durante a síntese. Este procedimento permitiu que às AgNPs preparadas tivessem a concentração final de  $\text{Ag}^0 = 1,8.10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$  e  $\text{QUIT} = 0,2\text{g.L}^{-1}$ , compatíveis com as exigências do protocolo dos testes biológicos.

### 3.3.2. Síntese dos substratos SERS ativos, com AgNPs de diâmetro *ca.* 50-200 nm

#### 3.3.2.a. Síntese utilizando boroidreto e citrato

Síntese do col 4: o col 4 foi obtido de acordo com a modificação da síntese original do artigo descrito por (Creighton, Blatchford e Albrecht, 1979). Para tanto, em  $60,0\text{mL}$  de uma solução de  $\text{NaBH}_4$   $1,6.10^{-2} \text{mol.L}^{-1}$  foi adicionado gota a gota  $20,0\text{mL}$  de uma solução de  $\text{AgNO}_3$   $16,0.10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$ . A mistura foi feita em banho de gelo. Para a estabilização e melhor cobertura das AgNPs ao final da síntese foi adicionado  $0,6\text{mL}$  (Col 4A) ou  $1,0\text{mL}$  (Col 4B) de uma solução  $\text{Na}_3\text{Cit}$   $3,4.10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$ .

O col 4B foi utilizado para o estudo da cinética de agregação desse coloide na presença de 2-mercaptoetanol. Para este estudo utilizou-se as seguintes concentrações de 2-mercaptoetanol  $1,0 \cdot 10^{-4}$  e  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .

### 3.3.2.b. Síntese alternativa utilizando AA e Na<sub>3</sub>Cit

Síntese do col 5: o col 5 foi obtido de acordo com a síntese descrita por (Potara *et al.*, 2011). Para tanto, inicialmente foram preparadas as sementes de prata “seed” seguindo metodologia já estabelecida:

- Síntese das sementes de prata

Em 10mL de uma solução de AgNO<sub>3</sub>  $2,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  foi adicionado 10mL de uma solução de citrato de sódio  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e colocada em um banho de gelo sob agitação vigorosa. A essa mistura 0,6mL de NaBH<sub>4</sub>  $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  foi adicionado gota a gota.

- Síntese do col 5 utilizando as sementes de prata

Inicialmente preparou-se 7,0mL de uma solução de Quitosana 2g/L. A essa solução adicionou-se 0,2mL de uma solução de citrato de sódio  $38,8 \text{ mol.L}^{-1}$ , 0,1mL de uma solução de AA  $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  e 0,2mL de solução das sementes de prata previamente preparadas, em seguida gotejou-se 3,0mL de AgNO<sub>3</sub>  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . A síntese foi feita no banho de gelo.

A seguir várias modificações na síntese do col 5 foram feitas, variando-se as proporções de Na<sub>3</sub>Cit, AA, QUIT e AgNO<sub>3</sub>. As proporções molares utilizadas estão resumidas na Tabela 5:

**Tabela 5:** Proporções molares utilizadas na síntese do col 5

	AgNO <sub>3</sub>	Na <sub>3</sub> Cit	AA	QUIT	Seed (μL)
Col5A	1	0,245	1,25	2	75
Col5B	1	0,49	2,5	2	450
Col5C	1	0,46	0,056	-	-
Col5D	1	2,6	3,3	0,2	1400
Col5	1	2,6	3,3	2	200

### 3.4. TESTES BIOLÓGICOS

Os testes biológicos foram feitos em colaboração com Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. A mestranda Mariana Lopes realizou os testes de concentração inibitória mínima (CIM).

A ação antibacteriana dos sistemas estudados foi avaliada contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, e Gram – positivos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis*.

A determinação do perfil de susceptibilidade das bactérias às AgNPs e às AgNPs associadas à QUIT foram realizadas pelo método de diluição em caldo segundo recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Este método consiste na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), onde determinamos qual é a menor concentração em que há atividade antibacteriana.

A partir de uma solução estoque conhecida de AgNPs  $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  e dos outros componentes como QUIT  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  e antibióticos LV –  $5,53 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , TC –  $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , RP –  $2,43 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , BP –  $5,98 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , MP –  $5,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , AC –  $3,41 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , GT –  $4,18 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , VC –  $1,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e OC –  $4,98 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  foram obtidos uma diluição variando a concentração de  $0,125 - 64 \mu\text{g mL}^{-1}$  em um sistema de microdiluição em caldo, feito em placa de poliestireno contendo 96 poços de fundo chato, de acordo com as normas e recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010), órgão que normaliza testes de susceptibilidade microbiana à drogas.

Para a associação das AgNPs + antibióticos e AgNPs + QUIT + antibióticos foram selecionados diferentes antibióticos para cada grupo bacteriano devido a sua utilização rotineira e recomendações do CLSI: (i) para as bactérias Gram – positivas foram avaliados os antibióticos BP, VC, TC, STX, LV, RP, (ii) para as bactérias Gram – negativas foram avaliados os antibióticos TC, AC, GT, STX, LV, AP e MR. Para isto, foram utilizados a concentração subinibitória das AgNPs variando-se a concentração de antibióticos de  $0,03125 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 3.5. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 4 NA PRESENÇA DOS ANTIBIÓTICOS

As medidas LSPR do col 4A na presença dos antibióticos TC, BP e LV foram feitas para monitorar as mudanças da banda LSPR do coloide na presença destes adsorbatos.

Para tanto, foi preparada uma solução estoque  $1.10^{-1}\text{mol.L}^{-1}$  de antibiótico. Para obter-se concentrações milimolar ou menores foram feitas as seguintes misturas, por exemplo: em 2mL de suspensão coloidal adicionou-se  $2\mu\text{L}$  de solução estoque de antibiótico, resultando na concentração final  $1.10^{-4}\text{mol.L}^{-1}$  e  $20\mu\text{L}$  de solução estoque de antibióticos resultando numa concentração final  $1.10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ .

### 3.6. ESPECTROSCOPIA RAMAN E SERS

- Espectros Raman dos antibióticos

Os espectros Raman dos antibióticos LV BP, TC e RP no estado sólido foram obtidos utilizando FT-Raman com radiação excitante em 1064nm, com 32 acumulações e 30mW de potência;

- Espectros SERS do Cristal Violeta (Molécula prova em experimentos SERS)

Para verificar se às AgNPs preparadas nos col 4 e col 5 estavam em ressonância com o laser em 1064nm utilizou-se o cristal violeta como molécula prova, uma vez que este adsorbato tem sinal SERS já conhecido e relatado na literatura.

- Preparo de uma solução estoque de cristal violeta (CV)  $1,0.10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ ;

- Mistura de  $450\mu\text{L}$  da suspensão coloidal +  $50\mu\text{L}$  da solução estoque de CV;

- Obtenção dos espectros SERS do CV, na suspensão coloidal, no espectrômetro FT-Raman com radiação excitante de  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ , resolução de  $4\text{cm}^{-1}$ , 400mW de potência e 500scans; foi utilizada a configuração macro, com coleta da radiação espalhada a  $180^\circ$  e a amostra em tubos de Duran.

- Espectros SERS dos antibióticos

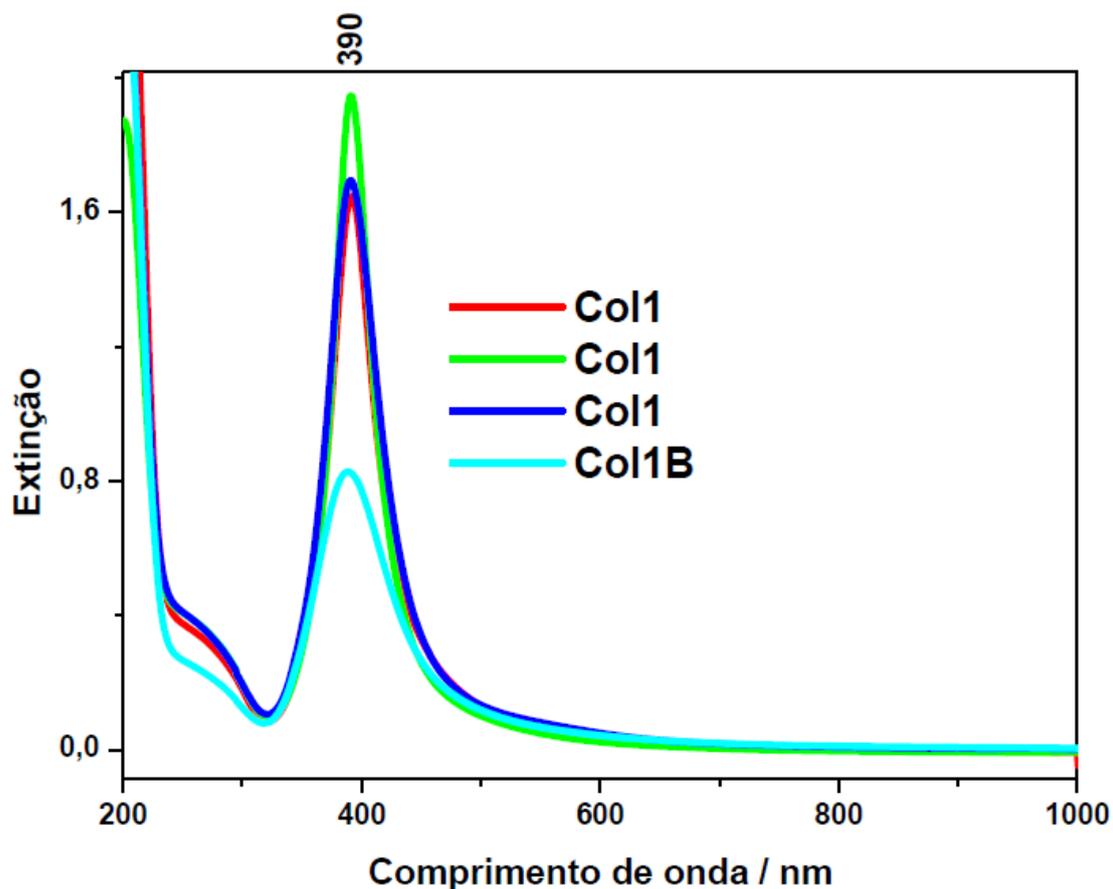
As medidas SERS foram obtidas para o estudo da adsorção química dos antibióticos estudados sobre a superfície metálica. Para tanto, utilizamos a seguinte metodologia: preparo de uma solução estoque dos antibióticos (TC, BP, LV, RP) na concentração  $1,0.10^{-2}\text{mol.L}^{-1}$ ;

- 450  $\mu\text{L}$  das AgNPs preparadas de acordo com item 3.3.3 + 50 $\mu\text{L}$  do antibiótico  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ;
- Obtenção dos espectros SERS da TC, LV, BP no espectrômetro FT-Raman com radiação excitante de  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ , resolução de  $4\text{cm}^{-1}$ , 400mW de potência e 2000scans; foi utilizada a configuração macro, com coleta da radiação espalhada a  $180^\circ$  e a amostra em tubos de Duran.
- Os espectros SERS da RP foram obtidos utilizando equipamento micro Raman HORIBA, com radiação excitante  $\lambda_0 = 638\text{nm}$  com potência de 0,4mW e 10 acumulações; na configuração do microscópio a radiação espalhada foi coletada a  $180^\circ$  e a radiação excitante foi focada diretamente sobre uma gota da suspensão.
- Foram obtidos ainda os espectros SERS da BP, LV utilizando micro Raman HORIBA com radiação excitante  $\lambda_0 = 532\text{nm}$  para BP e radiação excitante  $\lambda_0 = 638\text{nm}$  para a LV, todos com 0,4mW de potência e 10 acumulações; na configuração do microscópio a radiação espalhada foi coletada a  $180^\circ$  e a radiação excitante foi focada diretamente sobre uma gota da suspensão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. ESPECTRO LSPR DO COLOIDE 1

A Figura 12 mostra o espectro de extinção das AgNPs em 5 amostras de coloides preparadas de acordo com a síntese descrita para o col 1.

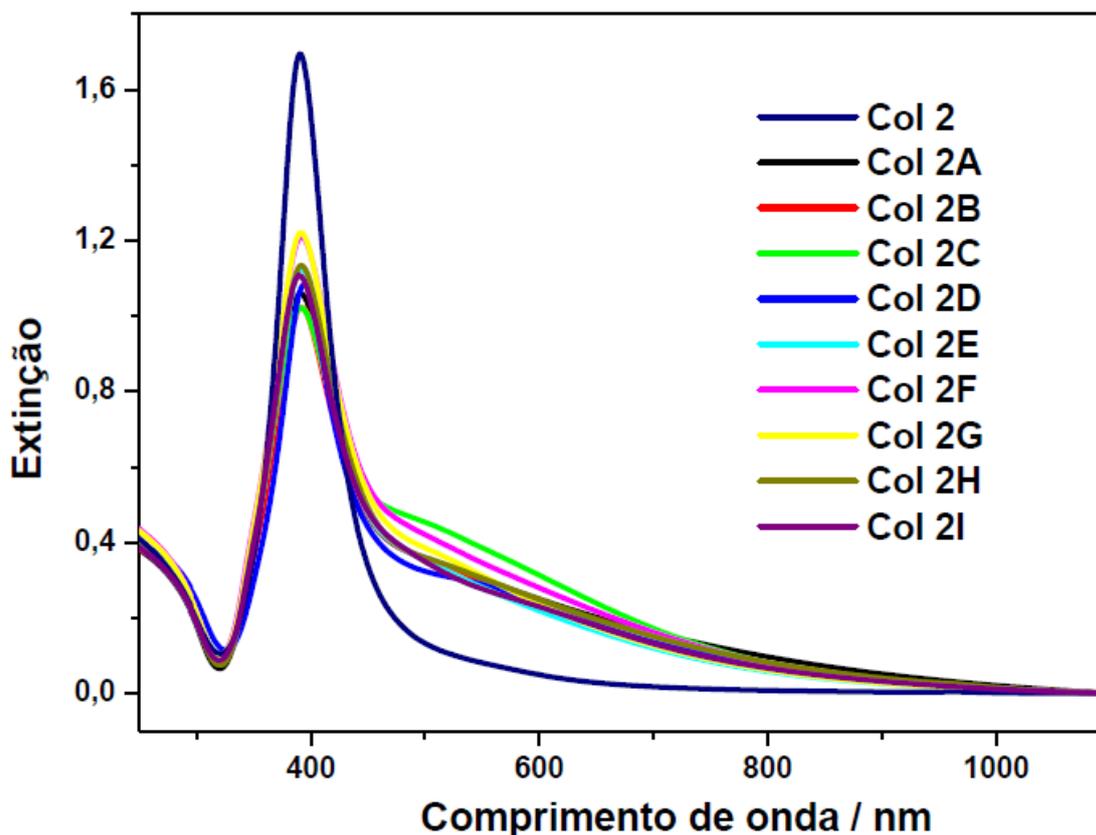


**Figura 12:** Espectro de extinção das AgNPs preparadas de acordo com a modificação da síntese descrita por (Grabar *et al.*, 1996). Caminho óptico: 1cm; Diluição: 10x

A banda LSPR do Col 1 apresenta um máximo de absorção em 390nm e pequena absorção na região do vermelho do espectro de extinção. Este padrão espectral é característico de NPs pequenas que são adequadas para a realização dos testes biológicos. Além disso, a síntese descrita é altamente reprodutível como mostra as diferentes sínteses de col 1 da Figura 12, utilizadas nos testes biológicos. O aumento da concentração de  $\text{AgNO}_3$  no col 1B provoca um alargamento da banda LSPR, bem como a maior intensidade na região de 800 nm. O col 1A não foi utilizado nos testes biológicos, pois este possuía uma concentração de Ag de  $2,54 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$ , que é uma ordem de grandeza menor que a concentração de partida exigida nos testes biológicos.

#### 4.2. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 2

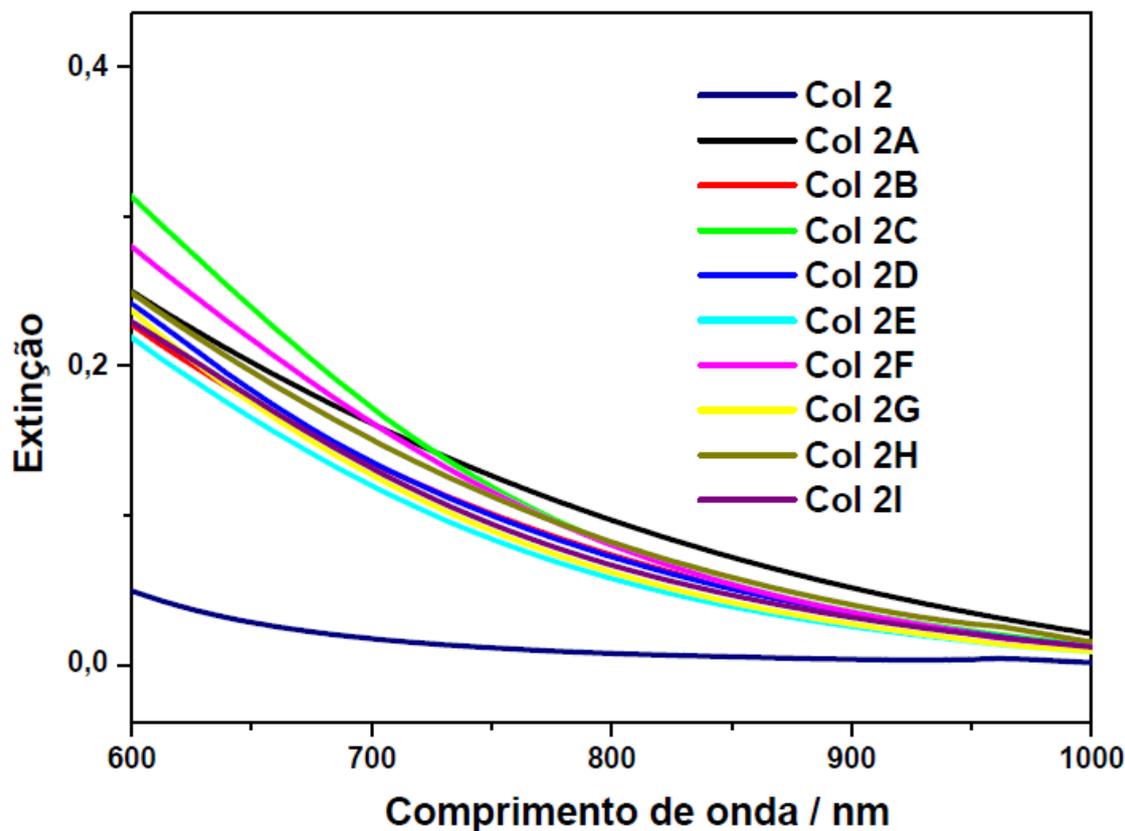
A Figura 13 mostra o espectro de extinção do col 2 preparado de acordo com a modificação da síntese descrita por (Grabar *et al.*, 1996). As modificações da banda LSPR do col 2 permite monitorar as variações na distribuição de tamanho das NPs quando a este é adicionado QUIT e HAc (Tabela 2).



**Figura 13:** Espectros de extinção do col 2 preparado com e sem adição de HAc  $0,1\text{mol.L}^{-1}$  e QUIT  $0,2\text{g.L}^{-1}$ . Caminho óptico: 1cm; Diluição 10x

Através da Figura 13 verifica-se que ocorreu uma diminuição na absorção da banda do LSPR em 390nm e um alargamento por volta de 600nm, indicando que houve modificação no tamanho das nanopartículas quando a essas foi incorporada QUIT e HAc.

A Figura 14 mostra a ampliação do espectro na região de 600-1100nm, dos mesmos espectros da Figura 13, onde verifica-se a agregação do coloide na presença da QUIT e HAc, devido ao aumento da extinção do col 2 nessa região.



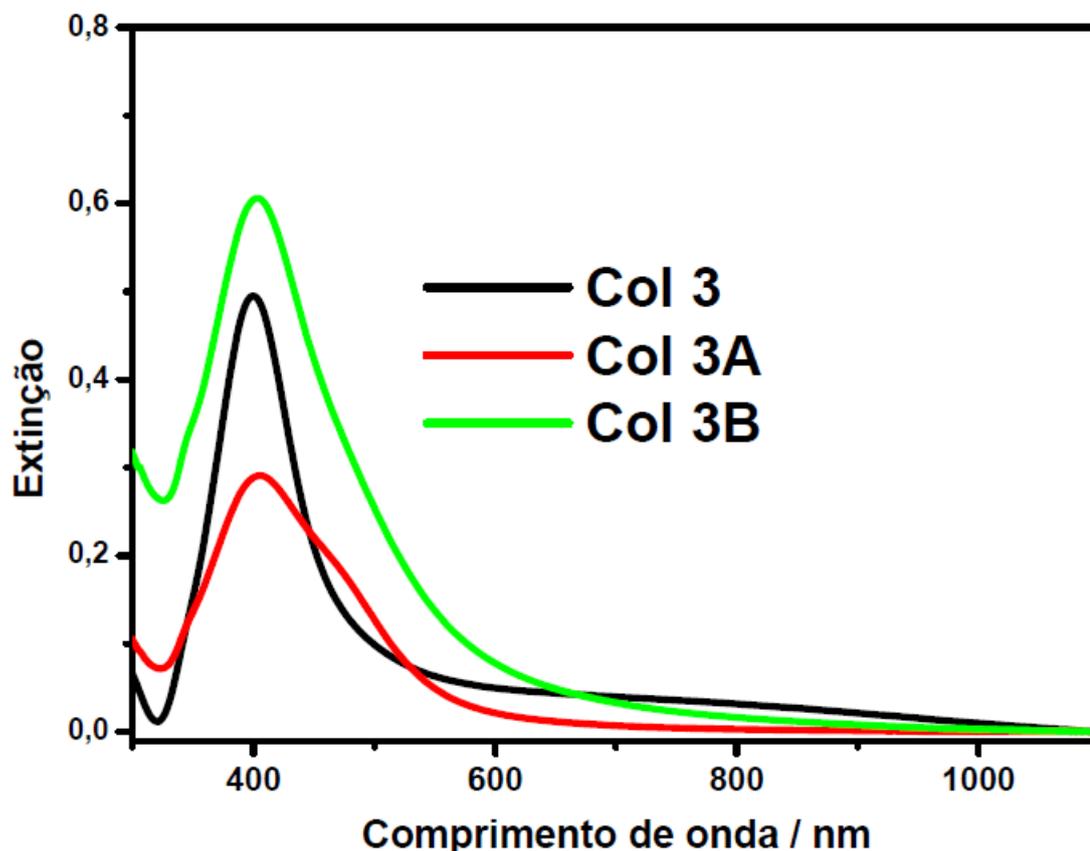
**Figura 14:** Espectro de extinção do col 2 preparado com adição de QUIT  $0,2\text{g.L}^{-1}$  e HAc  $0,1\text{mol.L}^{-1}$  com ampliação na região 600-1100nm

Pode-se concluir através da Figura 14 que as variações nas quantidades de QUIT e HAc influenciam na banda LSPR do col 2, onde verificamos que maiores quantidades de QUIT e HAc (col 2E e col 2G –Figura 14) estabilizam mais as AgNPs, mostrando menor extinção na região do vermelho do espectro UV-VIS.

Essa síntese não foi utilizada nos testes biológicos, pois verificamos uma larga distribuição de tamanhos quando incorporamos QUIT nas AgNPs. Além disso, esse estudo foi feito com uma concentração de QUIT menor que a necessária para os testes biológicos ( $2\text{g.L}^{-1}$ ), que devem estar de acordo com as normas CLSI.

### 4.3. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 3

A Figura 15 mostra o espectro de extinção do col 3 preparado sem adição de QUIT (mesma síntese dos col 2 e col 1B), col 3A preparado com adição de quitosana  $2\text{g.L}^{-1}$  sem HAc e o col 3B preparado com adição de quitosana  $2\text{g.L}^{-1}$  e HAc concentrado.

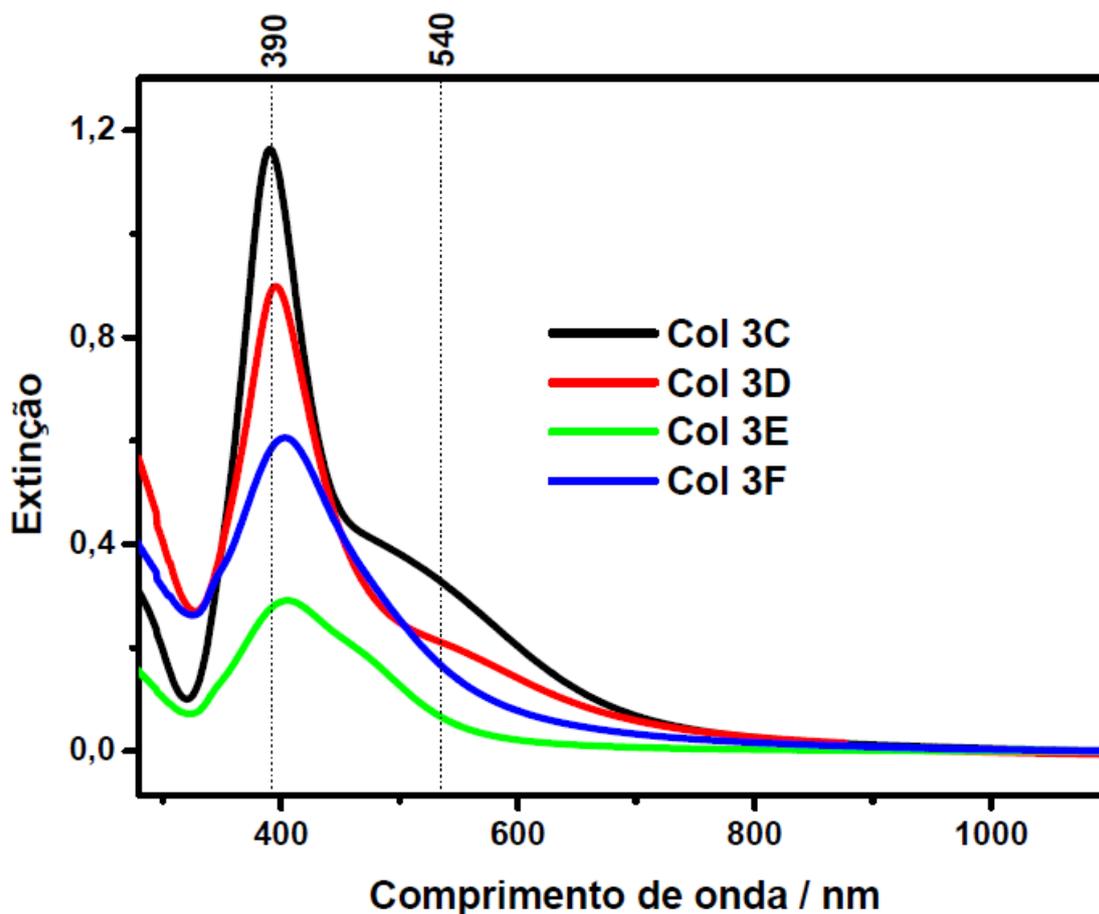


**Figura 15:** Espectro de extinção dos colóides 3, preparados com e sem adição de QUIT e HAc

A Figura 15 mostra que quando adicionamos QUIT nas AgNPs sem a modificação do pH do meio (col3A) ocorre a agregação da suspensão coloidal, mostrando uma larga distribuição de tamanhos. A incorporação de QUIT na suspensão levou à agregação do coloide devido à coagulação da quitosana em meio básico ou neutro, sendo esta agregação reversível em meio ácido (Saini *et al.*, 2011). Para tanto, foi adicionado ao col 3A, 0,5mL de HAc glacial (col3B) para não modificarmos a concentração de Ag no coloide original, uma vez que a concentração final de Ag na suspensão influencia nos testes biológicos. O espectro de extinção do Col3B foi obtido 18 horas após a síntese, onde verificamos que ocorria uma queda na absorção da suspensão coloidal na região do vermelho, mostrando que as AgNPs regrediram para

menores tamanhos do que aquelas obtidas do col 3, sem a adição de QUIT. Verificamos ainda, que a adição de QUIT e HAc ao col3 leva a uma distribuição mais larga de tamanhos.

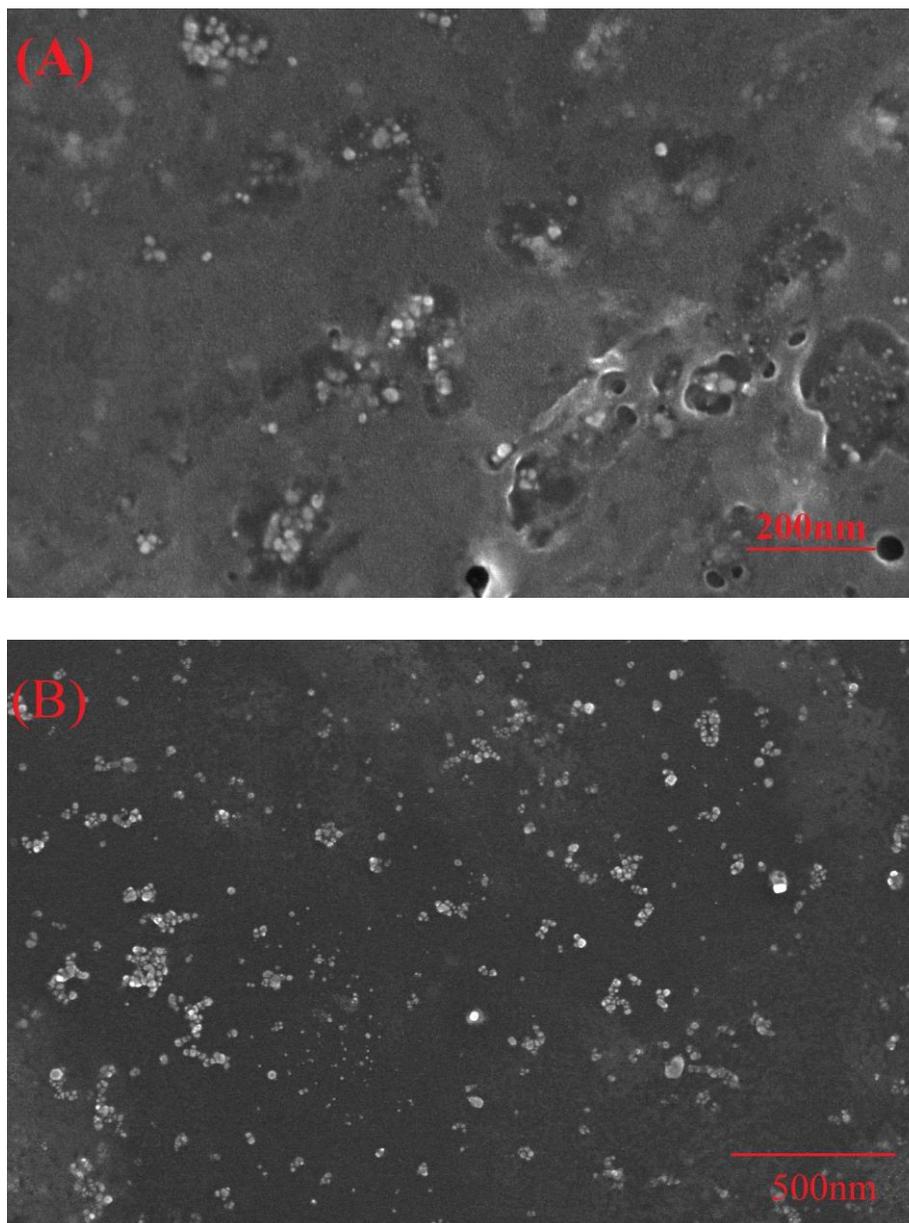
Foi feito ainda o estudo da reprodutibilidade do col 3 em diferentes preparações (Figura 16).



**Figura 16:** Espectro de extinção do col 3 preparado em 4 preparações. Caminho óptico 1 cm

Os espectros das diferentes sínteses do col 3 mostra duas distribuição de tamanhos associadas à banda em 390 nm, atribuída às partículas precursoras e um ombro em ca. 540 nm, atribuído a pequenos aglomerados estabilizados pela quitosana.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do col 3F foram obtidas para verificar se o coloide apresentava AgNPs de pequeno tamanho para maximizar o efeito antibacteriano.



**Figura 17:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura do col 3F. (A) maior magnificação e (B) menor magnificação

A Figura 17 (A) mostra AgNPs pequenas de 10nm (precursoras) e agregados maiores 15-50nm que se formam pela interação das AgNPs com quitosana presente na suspensão. A Figura 17 (B) mostra uma magnificação menor, em região com menos material orgânico, onde fica evidenciado a presença destes aglomerados maiores.

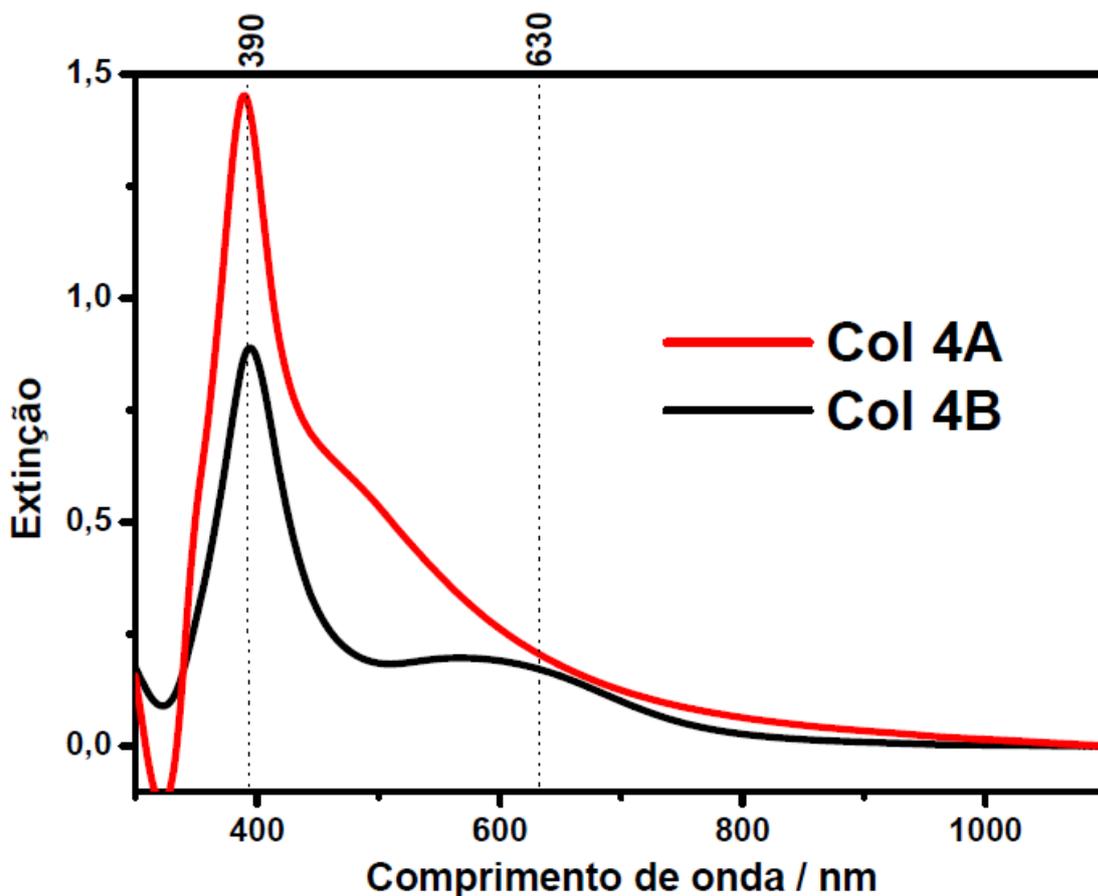
A análise do espectro de extinção e das imagens MEV permitem inferir que as AgNPs preparadas possuem tamanhos adequados para a interação com membrana celular das bactérias, sendo o tamanho das AgNPs um fator determinante da eficiência na ação antibacteriana (García-Barrasa, López-De-Luzuriaga e Monge, 2011).

Dessa forma otimizamos a síntese respeitando-se as principais demandas: as concentrações de  $\text{Ag}^0 = 0,2\text{g.L}^{-1}$  e de quitosana em  $0,2\text{g.L}^{-1}$ , a distribuição estreita de tamanhos com pequenas dimensões e a estabilidade destes sistemas em concentrações tão grandes. Estas concentrações altas deveriam ser iguais às concentrações dos brancos (quitosana, nitrato de prata), pelo protocolo da CLSI. Com isso o col 3 foi a síntese escolhida para a realização dos testes biológicos.

#### **4.4. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 4**

Como tentativa de obtermos um substrato adequado para experimentos SERS fizemos uma modificação na síntese descrita por (Creighton, Blatchford e Albrecht, 1979), onde dobramos a concentração inicial de  $\text{AgNO}_3$  e ao final da síntese adicionamos uma solução de citrato de sódio  $1,6 \cdot 10^{-1}\text{mol.L}^{-1}$  para dar uma melhor cobertura e estabilizar às AgNPs. A Figura 18 mostra o espectro de extinção do col 4 obtidos em duas sínteses preparadas variando-se a concentração de  $\text{Na}_3\text{Cit}$  adicionada ao final da síntese.

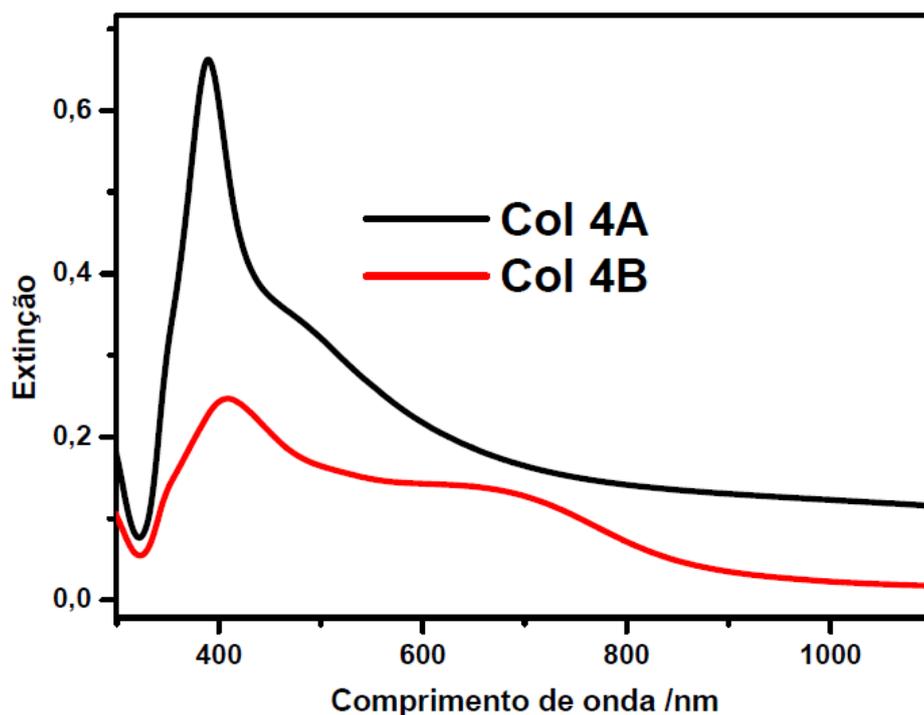
Os coloides 4 apresentaram uma larga distribuição de tamanhos. A extinção na região do vermelho e do infravermelho próximo permitiu a ressonância com as radiações excitante de comprimento de onda  $\lambda_0 = 532\text{nm}$ ,  $\lambda_0 = 638\text{nm}$ , e  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$  utilizadas nos experimentos SERS.



**Figura 18:** Espectro de extinção das AgNPs preparadas utilizando  $16 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  e  $3,4 \cdot 10^{-4}$  (col 4A) ou  $5,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (col 4B) de  $\text{Na}_3\text{Cit}$  para a estabilização e cobertura das AgNPs. Caminho óptico: 0,1cm

O Col 4A apresenta uma distribuição de tamanhos mais larga e uma maior extinção na região do vermelho e do infravermelho próximo que o Col 4B. Apesar disso, o col 4A possui grande número de partículas muito pequenas. O acréscimo de citrato no col 4B levou à estabilização de partículas de tamanhos intermediários, com um máximo bem definido na região de 600 nm. Os espectros SERS com melhor razão sinal/ruído foram obtidos a partir do Col 4A.

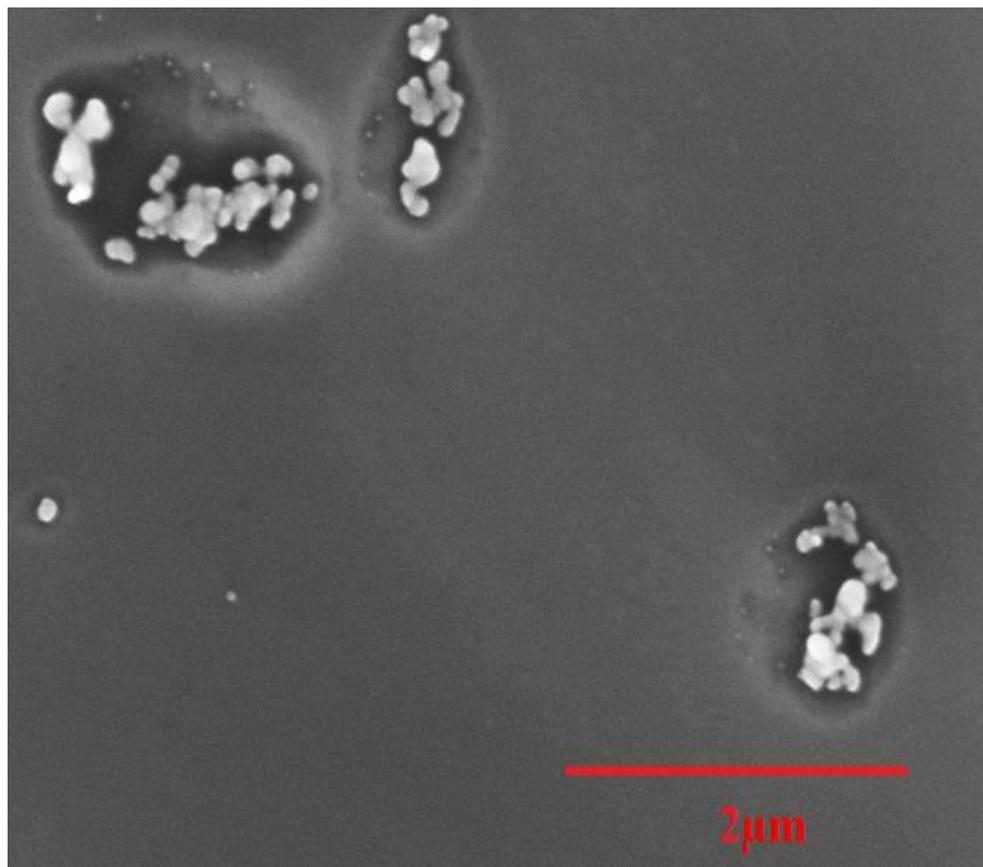
Foi feito o estudo da cinética de envelhecimento dos colóides 4 dentro da geladeira. A Figura 19 mostra o espectro de extinção após 8 meses de síntese.



**Figura 19:** Espectro de extinção do col 4 obtidos 8 meses após a síntese do coloide

Pode-se observar através das Figuras 18 e 19 que o envelhecimento da suspensão promoveu a agregação das AgNPs que é devido à reconstrução do coloide que ocorre sob refrigeração após certo tempo de síntese, uma vez que os processos de agregação e cristalização continuam ao longo do tempo. As modificações no col 4B foram mais pronunciadas que no col 4A e a elevada extinção em 1100 nm deste último justifica os melhores espectros SERS com excitação em 1064nm.

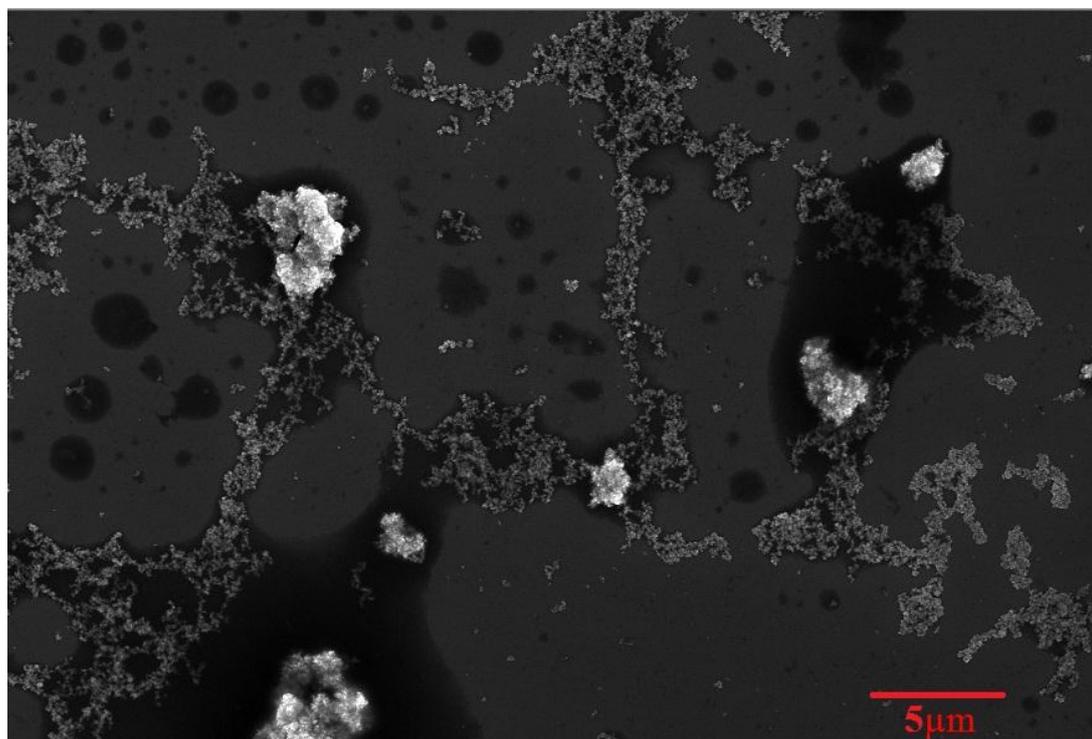
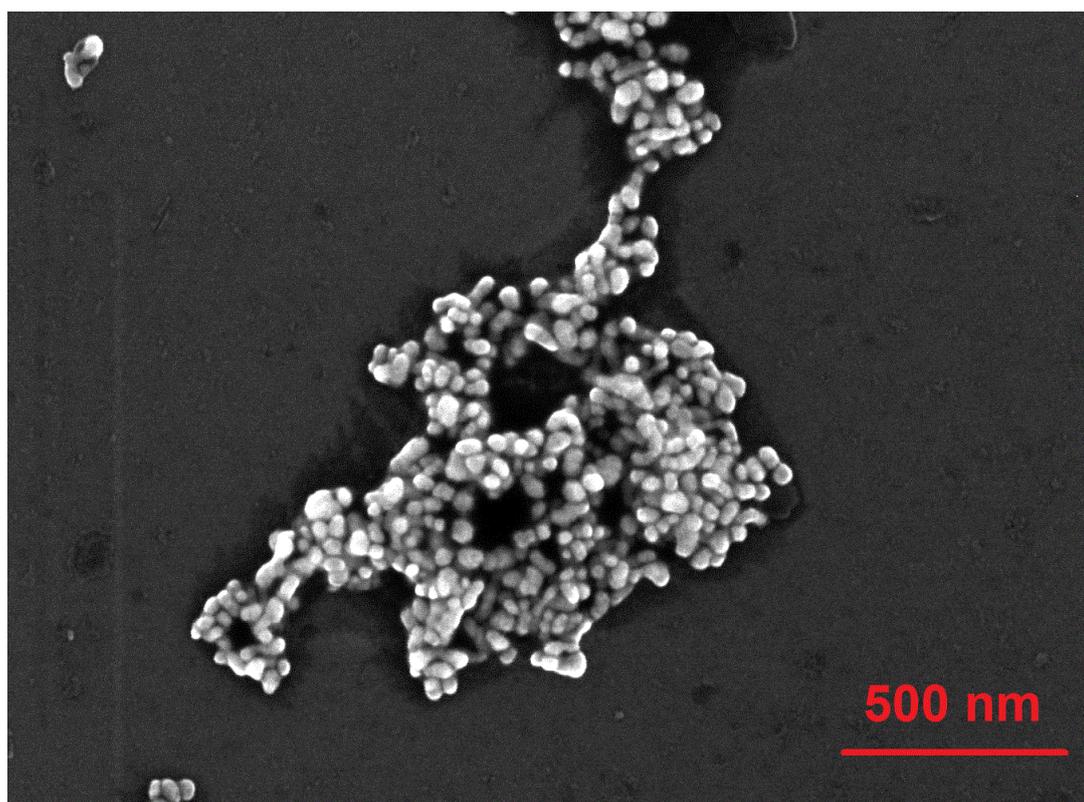
A Figura 20 mostra as imagens MEV do col 4A recém preparado.



**Figura 20:** Imagens SEM do col 4A recém preparado

A análise das micrografias do col 4A mostra AgNPs com tamanhos 50-100nm, com agregados maiores de 300-500nm. Pode-se observar, também, a presença de partículas precursoras de 10-20nm. O col 4A mostrou AgNPs com uma larga distribuição de tamanhos, sendo esta responsável pela intensificação dos sinais Raman dos adsorbatos com diferentes radiações excitantes ( $\lambda_0 = 532\text{nm}$ ,  $\lambda_0 = 638\text{nm}$  e  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ ).

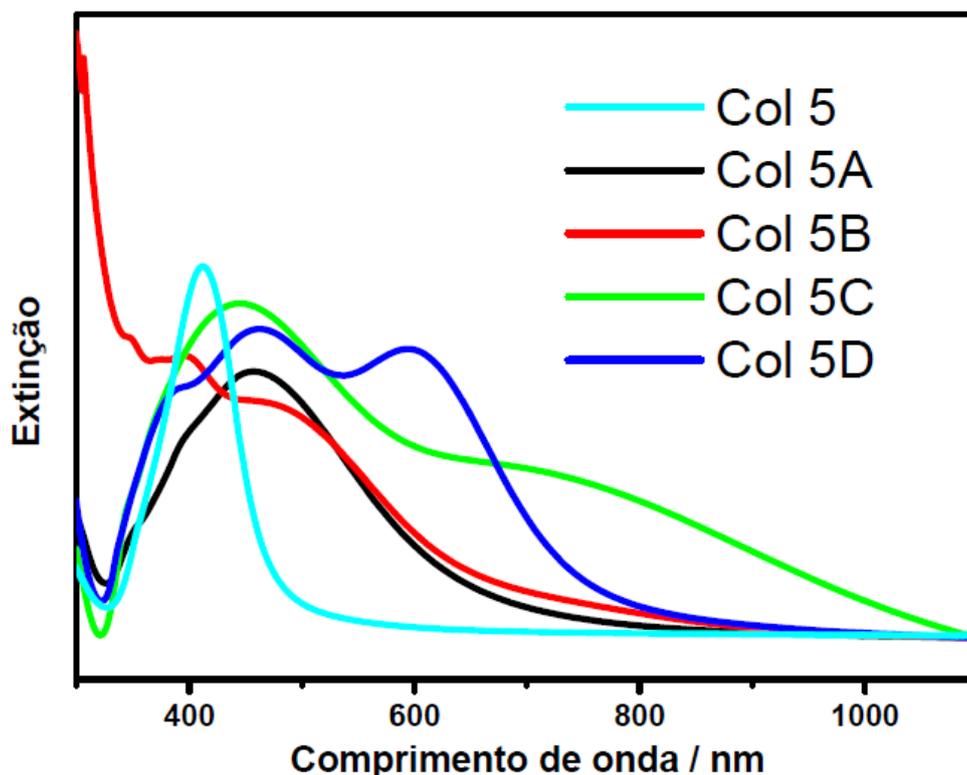
A Figura 21 mostra as micrografias do col 4A obtidas após 8 meses de síntese, onde verifica-se a agregação da suspensão como um todo, com aglomerados formados devido à alta reatividade das facetas das partículas precursoras do coloide recém preparado, que tendem a se reorganizar em estruturas bem mais cristalinas e estáveis. No entanto, ainda pode-se observar a presença de partículas pequenas (20-50 nm), precursoras dos grandes aglomerados.



**Figura 21:** Imagens MEV do col 4A obtidas após 8 meses de síntese. (A) maior magnificação e (B) menor magnificação

#### 4.5. ESPECTROS LSPR DO COLOIDE 5

A síntese do col 5 utiliza como redutor o AA na presença de  $\text{Na}_3\text{Cit}$ . O AA é um redutor mas fraco que o  $\text{NaBH}_4$  reduzindo  $\text{AgNO}_3$  somente quando é adicionado  $\text{Na}_3\text{Cit}$  à reação. A Figura 22 mostra o espectro de extinção das AgNPs utilizando metodologia descrita no item 3.3.4 desta dissertação.



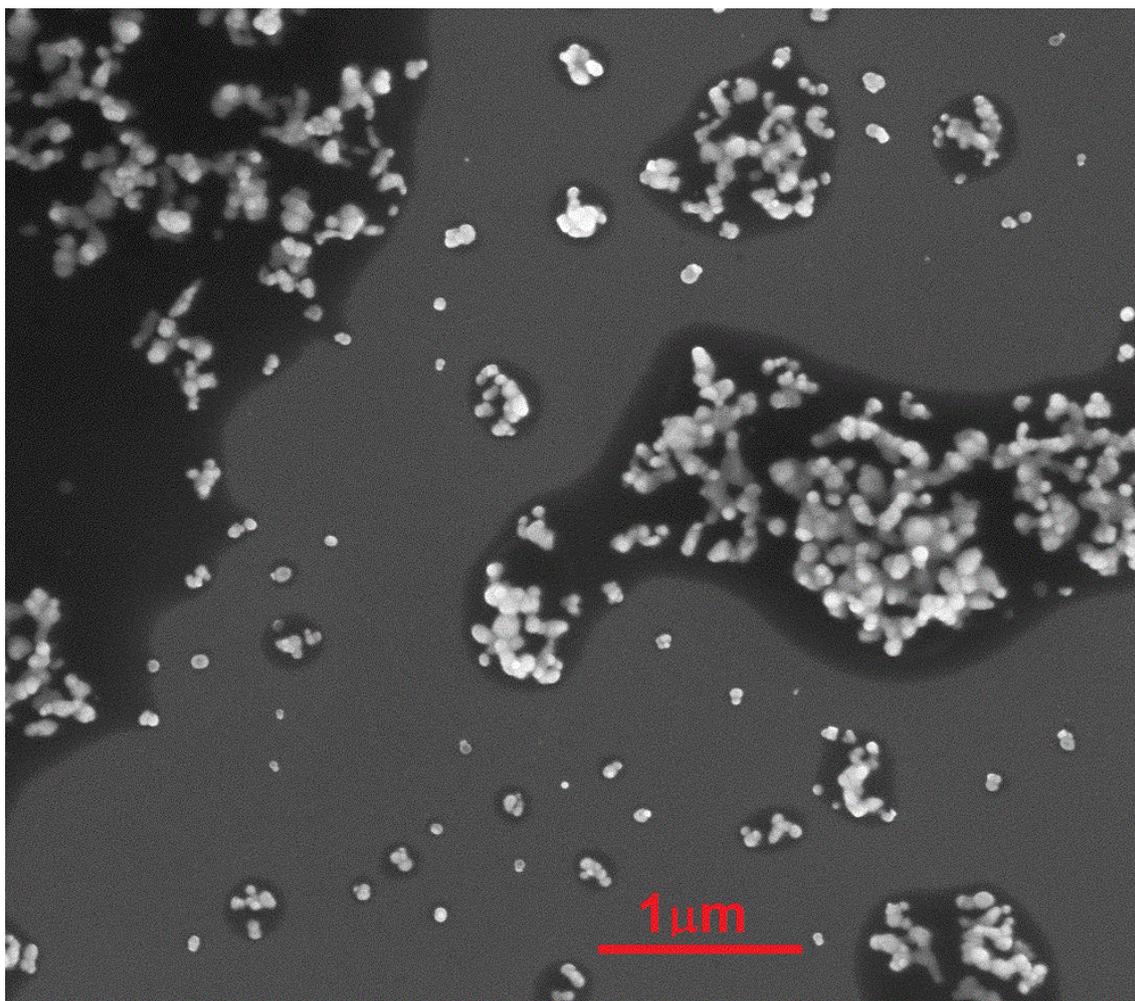
**Figura 22:** Espectro de extinção das AgNPs preparadas variando a concentração de  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Na}_3\text{Cit}$ , AA, QUIT e sementes de prata na reação

Quando comparamos os colóides preparados de acordo com Tabela 5 verificamos que para os colóides 5A, 5D e 5 que grandes quantidades de partículas nucleadoras levam a formação de partículas menores e que a ausência de partículas nucleadoras e QUIT levam a uma distribuição bem larga de tamanhos, devido a extinção na região do vermelho e do infravermelho próximo do espectro UV-VIS.

Já quando comparamos os colóides 5 e 5D verificamos que o aumento na concentração de prata e uma diminuição na quantidade de QUIT levam à formação de AgNPs com uma distribuição mais larga de tamanhos mostrando que a QUIT influencia

na estabilização das AgNPs e que o aumento na concentração de  $\text{AgNO}_3$  influencia na cinética de crescimento por agregação, formando partículas maiores e consequentemente alargando a banda do plasmon de superfície.

Essas sínteses não foram utilizadas nos testes biológicos, devido a larga distribuição de tamanhos do col 5, pois o AA é um redutor mais fraco que o  $\text{NaBH}_4$ , promovendo a formação de AgNPs maiores que as obtidas nas sínteses do col 1 e 2. A Figura 23 mostra a imagem MEV do col 5C.



**Figura 23:** Imagem MEV do col 5C

As micrografias mostram AgNPs com tamanhos 70-100nm, com alguns agregados maiores com tamanhos 100-300nm.

#### 4.6. TESTES BIOLÓGICOS

Os perfis de susceptibilidade bacteriana do AgNO<sub>3</sub>, AgNPs, QUIT e da associação AgNPs + QUIT são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias ao AgNO<sub>3</sub>, AgNPs, QUIT e as AgNPs+QUIT

Linhagem Bacteriana	CIM (µg.mL <sup>-1</sup> )			
	AgNO <sub>3</sub>	AgNPs	QUIT	AgNPs + QUIT
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	32	64	16	16
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	32	64	16	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	64	64	16	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	16	32	16	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	32	>64	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	64	>64	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	64	>64	16	16
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	32	>64	16	16

A Tabela 6 mostra que a quitosana e a associação AgNPs + QUIT mostraram-se mais eficientes na inibição do crescimento bacteriano, quando comparadas com AgNO<sub>3</sub> e AgNPs.

Considerando-se que o número de átomos de prata na suspensão coloidal disponível para a interação com as bactérias é muito menor que o disponível na solução de nitrato de prata, uma vez que as AgNPs possuem em sua superfície apenas uma pequena fração dos átomos de Ag<sup>0</sup>, os valores de CIM apresentados na Tabela 6, mostram que, apesar disso, os valores das duas primeiras colunas são comparáveis.

Os perfis de susceptibilidade das bactérias Gram-negativas aos antibióticos TC, AC, GT, SXT, LV e MP, obtidos pela análise de CIM, são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias Gram – negativas aos antibióticos testados

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	TC	AC	GT	SXT	LV	MP
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	4	4	4	1	0,5	4
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	0,5	8	4	1	1	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	16	0,5	32	2	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	8	2	1	*	2	1

TC (tetraciclina); AC (amicacina); GT (gentamicina); SXT (trimetropin-sulfametoxazol); LV (levofloxacina); MP (meropenem) \*Resultado a ser repetido.

Os perfis de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos OC, VC, TC, STX, LV e RP são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	OC	VC	TC	STX	LV	RP
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	32	4	16	8	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,25	0,5	16	0,25	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,25	1	1	*	8	1
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	*	32	4	1	*	16

OC (oxacilina); VC (vancomicina); TC (tetraciclina); SXT (trimetropin-sulfametoxazol); LV (levofloxacina); RP (rifampicina); \*Resultado a ser repetido.

Os perfis de susceptibilidade das bactérias Gram-negativas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs na concentração sub-inibitória ( $32\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-negativas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs na concentração sub-inibitória de  $32\mu\text{g.mL}^{-1}$ 

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	TC	AC	GT	SXT	LV	MR
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	2	0,03	0,03	1	0,5	0,03
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	0,5	0,03	0,03	1	0,125	0,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	4	0,03	0,03	2	1	0,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	2	0,03	0,03	2	0,25	0,03

TC (tetraciclina); AC (amicacina); GT (gentamicina); SXT (trimetropin-sulfametoxazol); LV (levofloxacina); MP (meropenem).

Os perfis de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs na concentração sub-inibitória ( $32\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10:** Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs na concentração sub-inibitória de  $32\mu\text{g.mL}^{-1}$ 

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
	OC	VC	TC	LV	RP
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	0,03	0,03	2	0,03	*
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,03	4	16	0,03	*
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,03	8	0,125	0,25	1
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	0,03	4	4	*	16

OC (oxacilina); VC (vancomicina); TC (tetraciclina); SXT (trimetropin-sulfametoxazol); LV (levofloxacina); RP (rifampicina); \*Resultado a ser repetido.

As Tabelas 7 e 8 mostram as CIM dos antibióticos testados para as bactérias Gram-positivas e Gram – negativas. As Tabelas 9 e 10 mostram os valores de CIM da associação dos antibióticos testados + AgNPs. De maneira geral, para todas as espécies bacterianas testadas houve uma diminuição na CIM quando houve a associação de AgNPs + antibiótico, mostrando uma eficiência aumentada em até 99% para os antibióticos GT, AM e MP.

Foram ainda avaliados, os perfis de susceptibilidade das bactérias Gram – negativas e Gram-positivas para a associação dos antibióticos testados + QUIT e para a associação antibióticos + QUIT + AgNPs.

Para a determinação das CIM para as AgNPs combinadas com antibióticos, ou com AgNPs combinadas com quitosana e antibióticos foram utilizadas duas amostras representativas de Gram – negativos (*Escherichia coli* ATCC 35218 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603) e duas representativas de Gram – positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299).

A Tabela 11 mostra o perfil de susceptibilidade das bactérias Gram – negativas aos antibióticos testados em combinação com QUIT na concentração sub-inibitória ( $8\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

**Tabela 11:** Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-negativas aos antibióticos testados em combinação com QUIT na concentração sub-inibitória  $8\mu\text{g.mL}^{-1}$

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )						
	TC	AC	GT	SXT	LV	BP	MP
<i>Escherichia coli</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

TC (tetraciclina); AC (amicacina); GT (gentamicina); SXT (trimetropin-sulfametoxazol); LV (levofloxacina); BP(benzilpenicilina); MP (meropenem).

A Tabela 12 mostra o perfil de susceptibilidade das bactérias Gram – positivas aos antibióticos testados em combinação com QUIT na concentração sub-inibitória ( $8\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

**Tabela 12:** Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados em combinação com QUIT na concentração sub-inibitória  $8\mu\text{g.mL}^{-1}$

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM $\mu\text{g/ml}$ )						
	BP	OC	VC	TC	STX	LV	RP
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

BP (benzilpenicilina); OC (oxacilina); VC (vancomicina); TC (tetraciclina); SXT (trimetropin-sulfametoxazol); LV (levofloxacina); RP (rifampicina);

A Tabela 13 mostra o perfil de susceptibilidade das bactérias Gram – negativas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs + QUIT na concentração sub-inibitória ( $8\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

**Tabela 13:** Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs + QUIT na concentração sub-inibitória  $8\mu\text{g.mL}^{-1}$

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )						
	TC	AC	GT	SXT	LV	AP	MP
<i>Escherichia coli</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

TC (tetraciclina); AC (amicacina); GT (gentamicina); SXT (trimetropin-sulfametoxazol); LV (levofloxacina); BP (benzilpenicilina); MP (meropenem).

A Tabela 14 mostra o perfil de susceptibilidade das bactérias Gram – positivas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs + QUIT na concentração sub-inibitória ( $8\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

**Tabela 14:** Perfil de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos antibióticos testados em combinação com AgNPs + QUIT na concentração sub-inibitória  $8\mu\text{g.mL}^{-1}$

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )						
	BP	OC	VC	TC	STX	LV	RP
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Enterococcus faecalis</i> )	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

BP (benzilpenicilina); OC (oxacilina); VC (vancomicina); TC (tetraciclina); SXT (trimetropin-sulfametoxazol); LV (levofloxacina); RP (rifampicina);

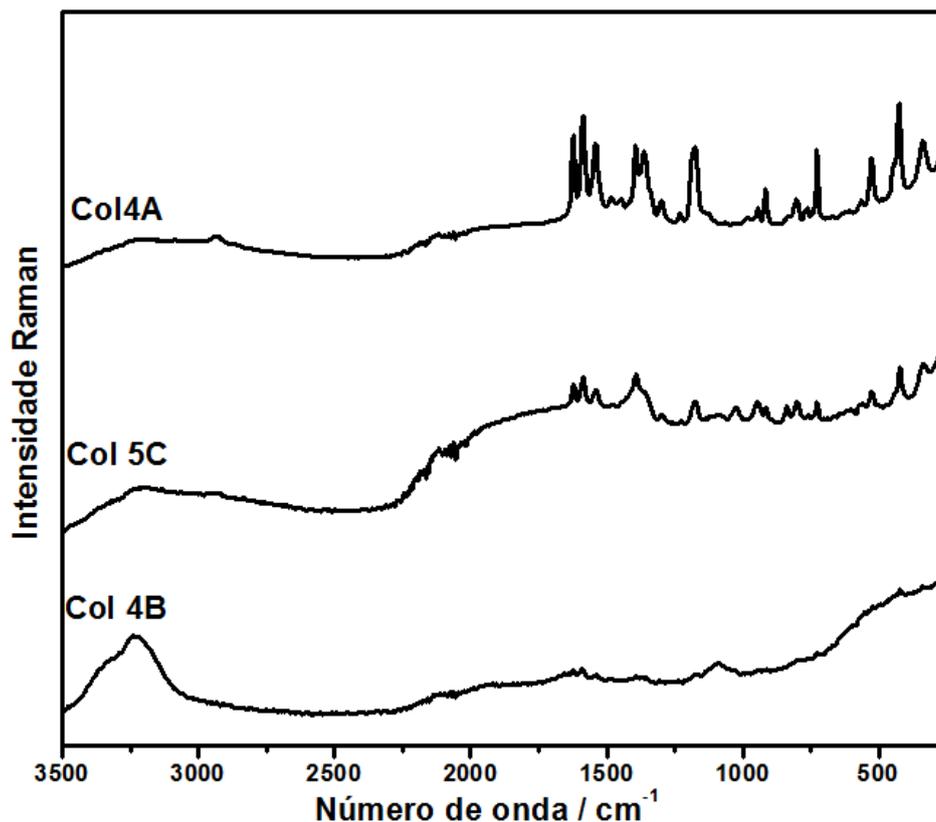
De modo geral, para todas as espécies bacterianas avaliadas, as associação de AgNPs + QUIT + antibiótico e a associação de QUIT + antibiótico apresentaram grande poder inibitório. A CIM em  $0,03\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi a menor concentração testada nos diferentes testes biológicos apresentados nesta dissertação. Testes adicionais variando-se a CIM para concentrações menores que  $0,03\mu\text{g.mL}^{-1}$  serão realizados para a verificação de interações sinérgicas ou não das AgNPs + QUIT + antibióticos.

## 4.7. ESPECTROS SERS E LSPR

### 4.7.1. Espectros Raman e SERS do cristal violeta

O CV foi escolhido como molécula prova por apresentar sinal SERS intenso e já conhecido (Li, Li e Yu, 1999). Para esse estudo, utilizaram-se os coloides Col 5C, Col 4A e Col 4B.

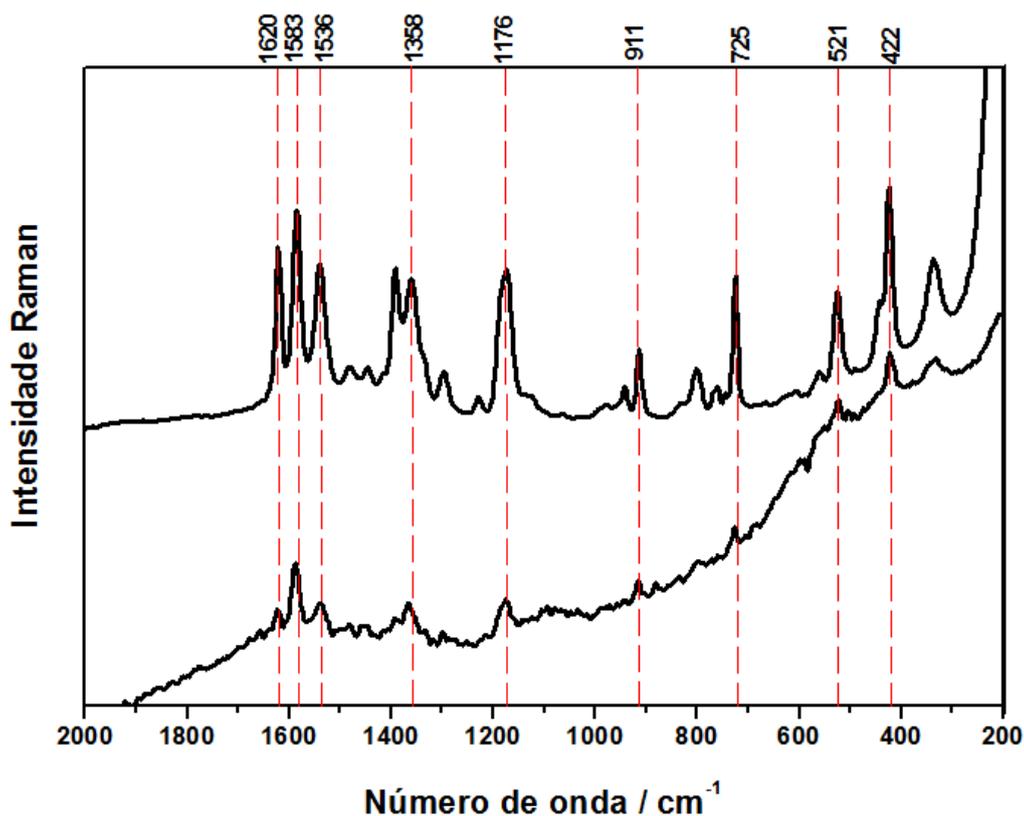
A Figura 24 mostra os espectros SERS do CV,  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  utilizando-se estes 3 substratos.



**Figura 24:** Espectros SERS do CV  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  utilizando o col 4A, col 4B e o col 5C.  $\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$

O col 4A apresentou sinal SERS mais intenso na radiação excitante de comprimento de onda  $\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$ , quando comparado com o col 4B e col 5C.

A Figura 25 mostra o melhor espectro SERS do CV,  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  comparado com o espectro Raman do CV,  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .

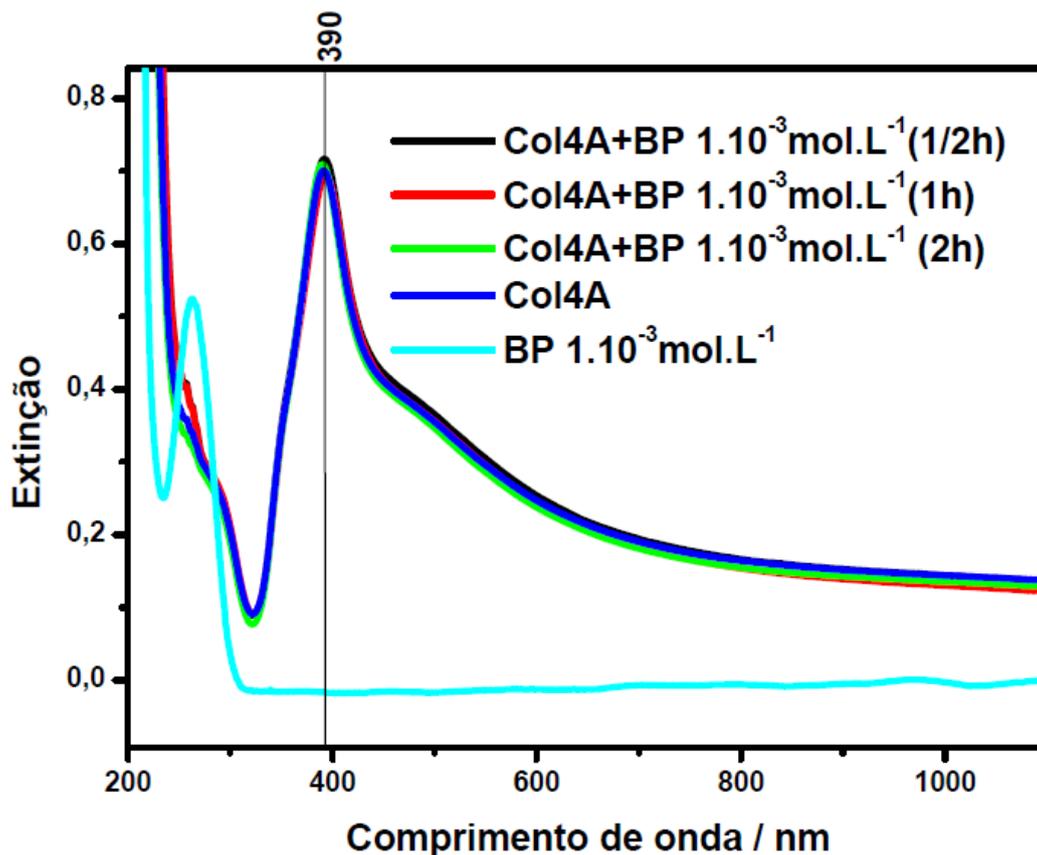


**Figura 25:** Espectro SERS do CV  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  utilizando o col 4A como substrato SERS (A). Espectro Raman da solução de CV  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .  $\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$  (B)

O espectro SERS do CV mostra as bandas em 1620, 1583, 1536, 1358, 1176, 911, 725, 521 e  $422 \text{ cm}^{-1}$  intensificadas quando comparadas ao espectro Raman da solução CV  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ , mostrando que o col 4A apresenta ressonância com a radiação excitante de  $\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$ . As bandas intensificadas no espectro SERS são devidas às mudanças na polarizabilidade molecular pela interação de sítios de coordenação com o metal e, também, pelas regras de seleção de superfície, onde os modos que são perpendiculares à superfície são intensificados, enquanto aqueles que são paralelos à superfície perdem a intensidade (Moskovits, 1982).

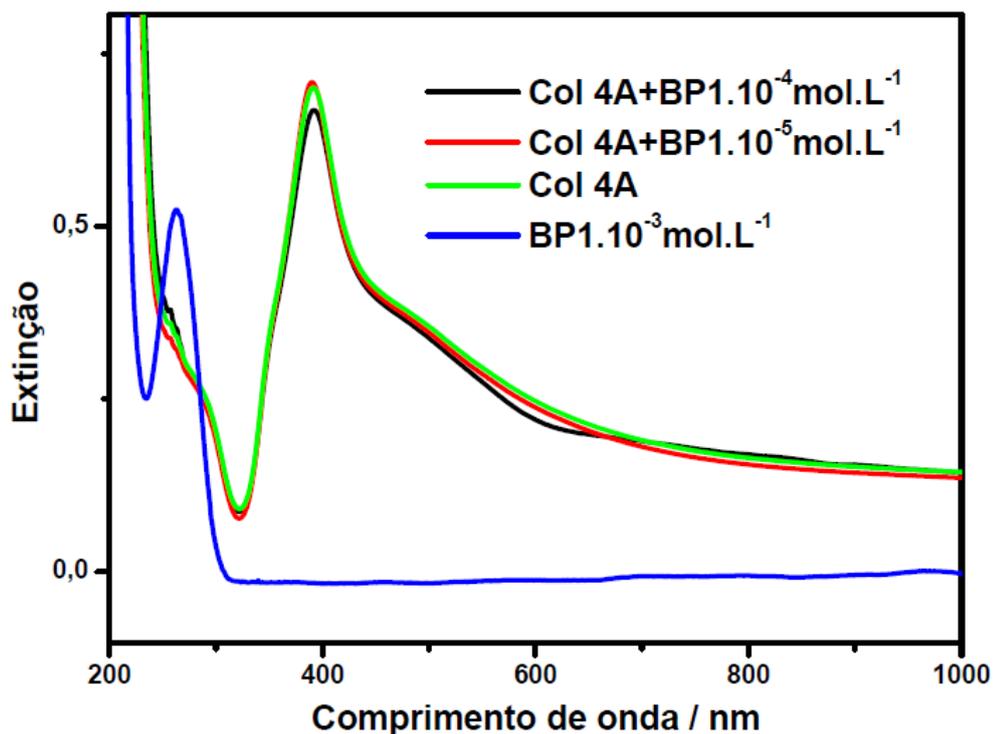
#### 4.7.2. Espectros LSPR do col 4A na presença da benzilpenicilina

A Figura 26 mostra as modificações no formato da banda LSPR do col 4A na presença ou não de BP na concentração  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .



**Figura 26:** Espectros de extinção normalizados do col 4A, na presença de BP  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , obtidos ao longo do tempo após a adição da BP e espectro de absorção da BP  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

O monitoramento da banda LSPR do col 4A na presença de BP  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  (Figura 26A) mostra diferenças na intensidade dos espectros com o tempo, sem grandes alterações na forma de linha. Assim, pode-se inferir que a BP não induziu agregação significativa das AgNPs. Foram obtidos ainda os espectros de extinção do col 4A na presença da BP nas concentrações  $1.10^{-4}$  e  $1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ , apresentados na Figura 28.

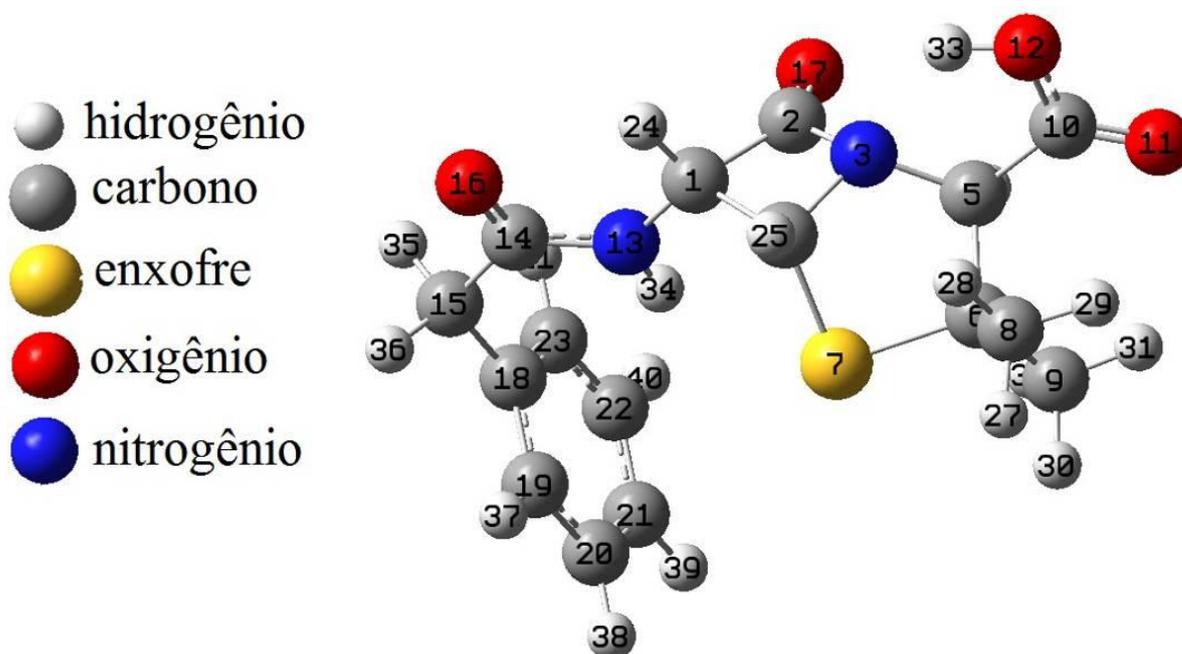


**Figura 27:** Espectros de extinção normalizados do col 4A, na ausência e na presença de BP  $1.10^{-4}$  e  $1.10^{-5}$  mol.L $^{-1}$  e espectro de absorção da solução aquosa de BP  $1.10^{-5}$  mol.L $^{-1}$  Caminho óptico: 0,1cm

As misturas do col 4A com BP nas concentrações  $1.10^{-4}$  e  $1.10^{-5}$  mol.L $^{-1}$ , também não mostraram mudanças significativas na forma de linhas, permitindo inferir que, do mesmo modo que na concentração  $1.10^{-3}$  mol.L $^{-1}$ , não ocorreu variação na distribuição de tamanhos das AgNPs.

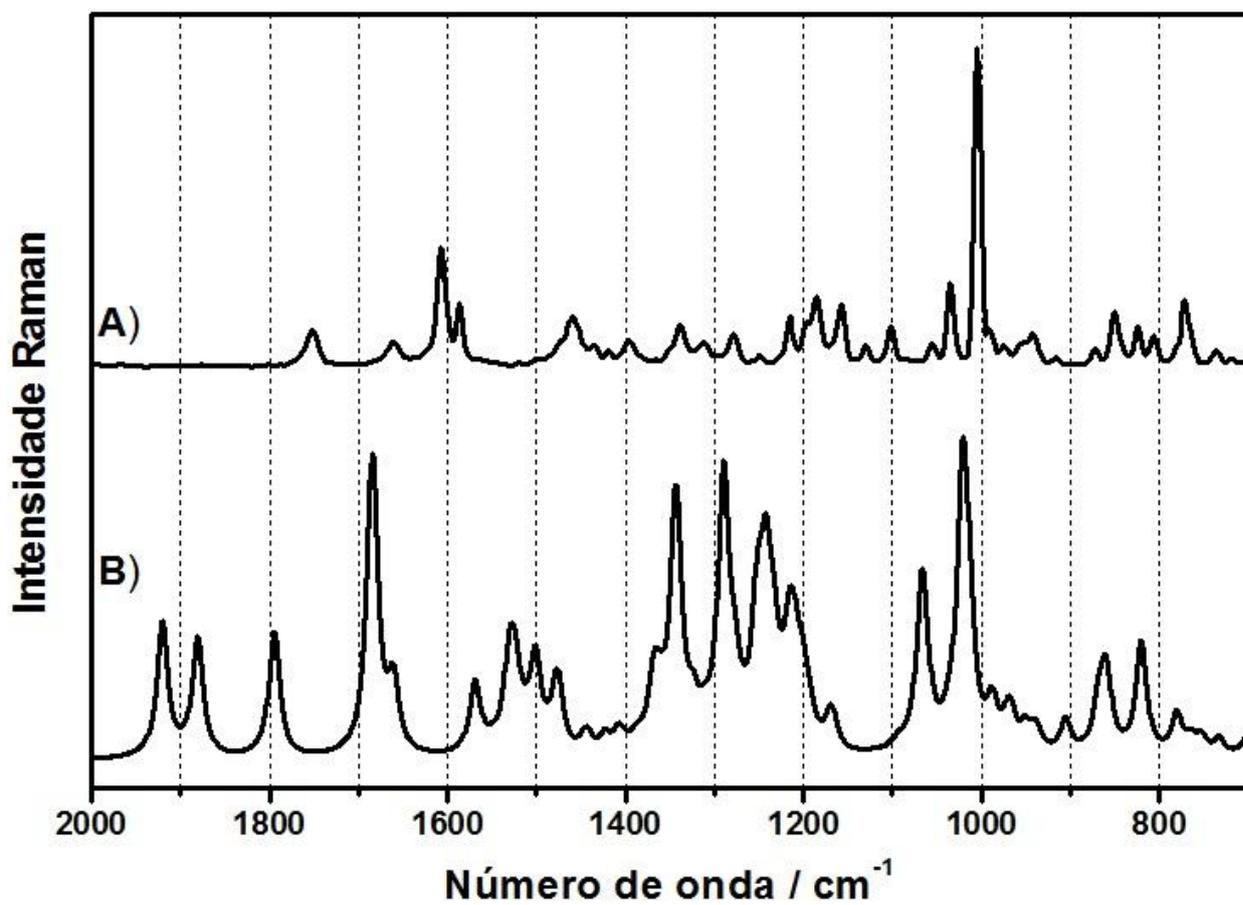
### 4.7.3. Espectro Raman e SERS da Benzilpenicilina

A Figura 28 mostra a geometria otimizada da BP obtida através de cálculos DFT com os átomos rotulados que serão utilizados para a discussão das atribuições vibracionais da BP. O  $pK_a$  da BP é 3,04 (Alekseev e Volkova, 2003), e envolve a desprotonação do ácido carboxílico ( $BPH \leftrightarrow BP^-$ ). Dessa forma, a espécie protonada é predominante no estado sólido e, o carboxilato é a espécie predominante no pH da suspensão das AgNPs que é *ca.* 6,0.



**Figura 28:** Geometria otimizada da BPH

A Figura 29 mostra o espectro Raman da BPH sólida obtido utilizando  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$  e o espectro Raman teórico da BPH isolada. As bandas Raman em  $1608$ ,  $1032$  e  $1004\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento CC do anel fenílico são as mais intensas no espectro Raman, sendo isto devido à alta polarizabilidade do anel fenílico. A banda Raman em  $1750\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento CO do ácido carboxílico mostra que no estado sólido a espécie predominante é o ácido carboxílico. As diferenças nos números de onda dos espectros teórico e experimental são uma consequência da anarmonicidade não ser considerada nos cálculos DFT.



**Figura 29:** Espectro Raman da BPH sólida  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$  (A). Espectro Raman calculado da BPH isolada (B)

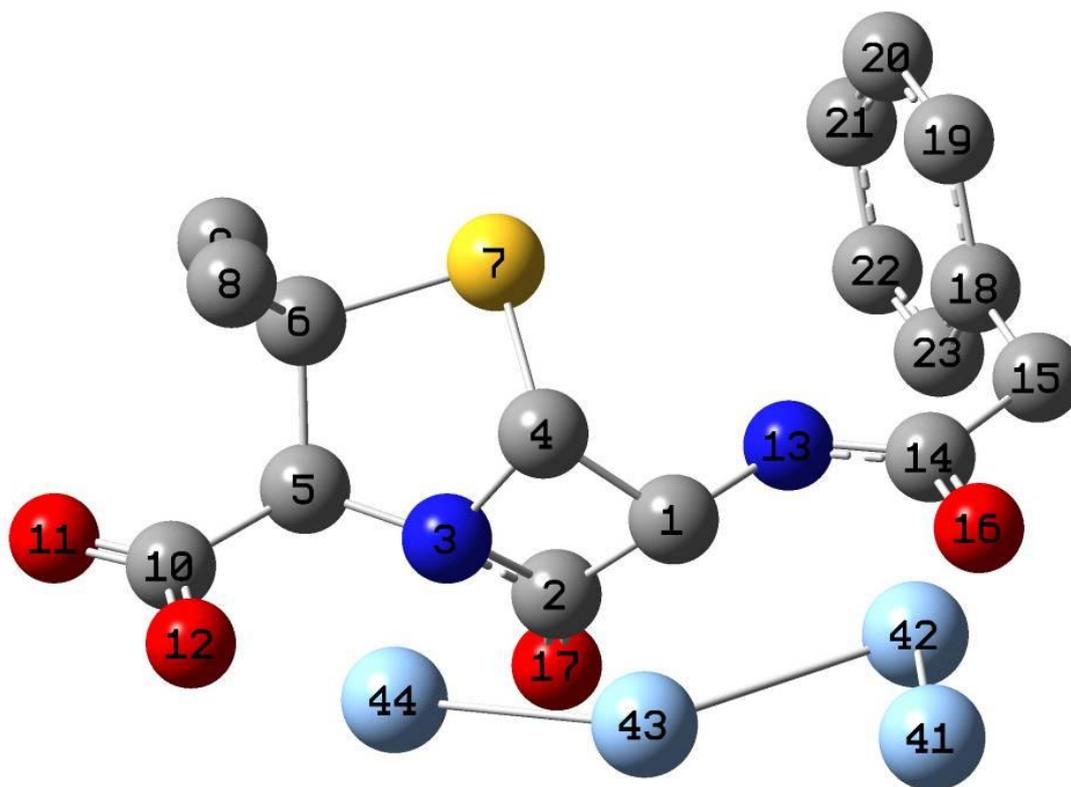
Na Tabela 15 são apresentados os números de onda das bandas mais intensas no espectro Raman da BPH e as bandas correspondentes do espectro teórico com a atribuição vibracional proposta.

**Tabela 15:** Atribuições vibracionais do espectro Raman da BPH obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada. Os números de onda estão em  $\text{cm}^{-1}$

		Atribuição vibracional
Experimental	Calculado	
$\lambda_0=1064\text{nm}$		
1763 <sub>(sh)</sub>	1920	$\nu(\text{C}^2\text{O}^{17})$
1750	1880	$\nu(\text{C}^{10}\text{O}^{11})$
1661	1794	$\nu(\text{C}^{14}\text{O}^{16})$
1608	1684	$\nu(\text{C}^{19}\text{C}^{20}) + \nu(\text{C}^{22}\text{C}^{23})$
1585	1568	$\nu(\text{C}^{14}\text{N}^{13})$
1338	1343	$\nu(\text{C}^{15}\text{C}^{18}) + \omega(\text{C}^{15}\text{H}_2)$
1275	1290	$\nu(\text{C}^1\text{N}^{13})$
1214	1213	$\nu(\text{C}^1\text{N}^{13}) + \delta(\text{CH})_{\text{sk}}$
1184	1201	$\nu(\text{C}^1\text{C}^4)$
1158	1168	$\nu(\text{C}^6\text{S}^7) + \delta(\text{C}^9\text{H}_3)$
1035	1066	$\nu(\text{CC})_{\text{Ph}}$
1004	1021	Respiração fenil

$\nu$  - estiramento;  $\delta$  - deformação angular; sh – ombro; Ph – fenil, sk – esqueleto.

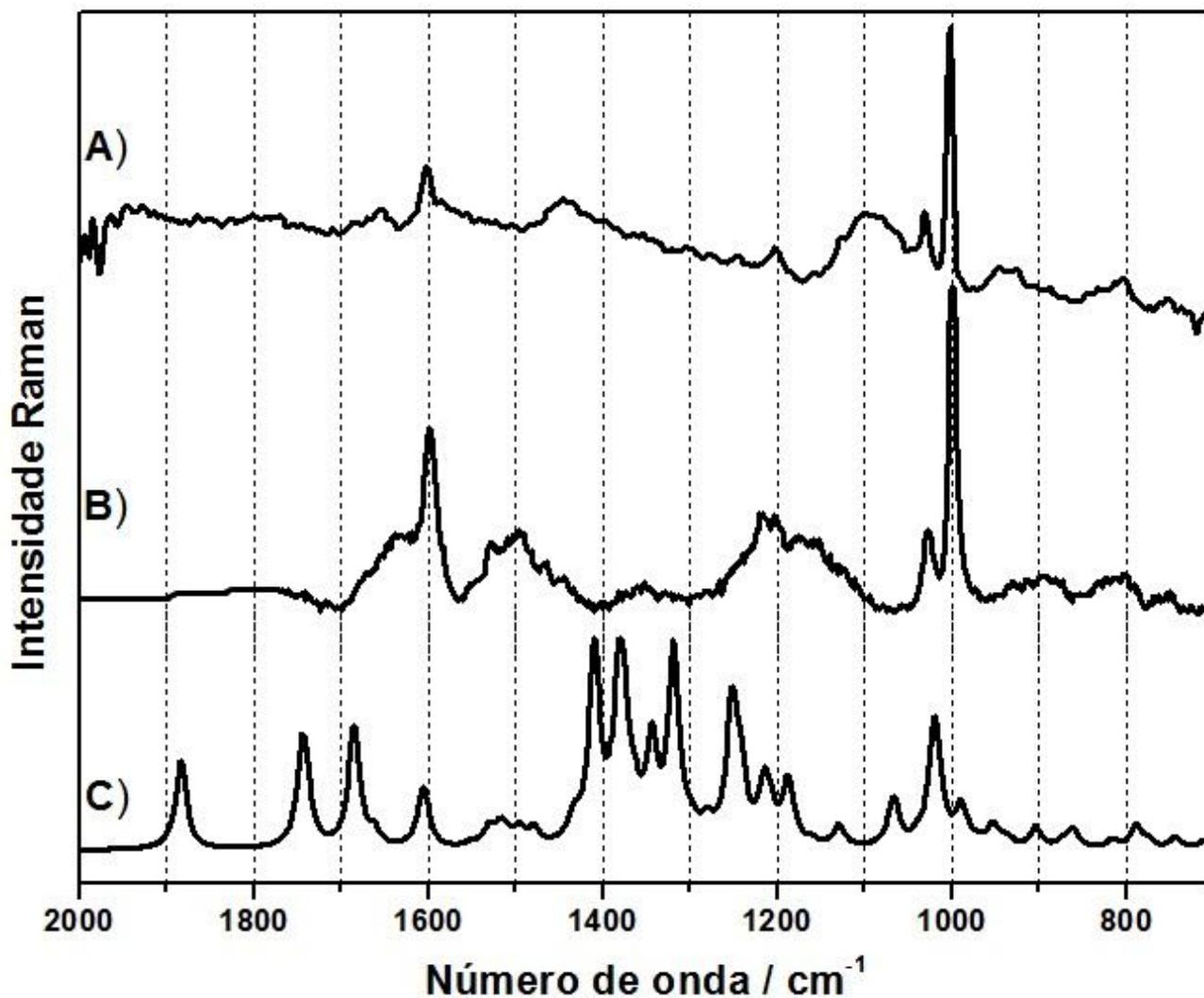
A Figura 30 mostra o modelo do complexo de superfície  $\text{Ag}_4\text{BP}^-$ , otimizado através de cálculos DFT, e utilizado na atribuição vibracional do espectro SERS.



**Figura 30:** Geometria otimizada da BP desprotonada interagindo com quatro átomos de prata. Os átomos de hidrogênio foram omitidos

A Figura 31 mostra os espectros SERS da BP<sup>-</sup> 1,0.10<sup>-3</sup>mol.L<sup>-1</sup> obtidos utilizando coloide de prata e as radiações excitantes em  $\lambda_0=1064\text{nm}$  e  $\lambda_0=532\text{nm}$  e o espectro teórico do complexo de prata. As bandas SERS em 1684 e 1655 cm<sup>-1</sup>, atribuídas ao estiramento assimétrico CO do carboxilato e ao estiramento CO da carbonila da amida, respectivamente, quando comparada com a banda em 1750cm<sup>-1</sup> no espectro Raman normal (Figura 29), atribuída ao estiramento CO do ácido carboxílico, indica que a BP está protonada no estado sólido, mas desprotonada quando adsorvida. Assim, podemos inferir que a BP<sup>-</sup> é a espécie predominante em meio aquoso e, também na superfície da prata. A ausência de uma banda SERS, atribuída ao estiramento CO da carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico, a qual é observada como um ombro em 1760 cm<sup>-1</sup> no espectro Raman experimental da molécula livre no estado sólido, indica que tal grupo não está interagindo com a superfície metálica. O espectro SERS obtido experimentalmente está de acordo com o espectro obtido através de cálculos DFT para o complexo Ag<sub>4</sub>BP<sup>-</sup>, no qual a molécula está adsorvida através da carbonilas do carboxilato e da amida linear.

De uma mesma forma, a presença das bandas SERS em 1202 e 945  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas aos modos normais envolvendo amida linear, reforça a hipótese de que tal sítio molecular está envolvido na interação com a superfície metálica.



**Figura 31:** Espectros SERS da  $\text{BP}^-$   $1,0 \cdot 10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$  obtido utilizando coloide de prata (col 4A) e  $\lambda_0 = 1064 \text{nm}$  (A) e  $\lambda_0 = 532 \text{nm}$  (B). Espectro Raman calculado do complexo  $\text{Ag}_4\text{-BP}^-$ . Espectros SERS com linha base ajustada com 20 pontos para melhor visualização das bandas (C)

As bandas intensificadas no espectro SERS em 1004, 1032 e 1603  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento CC do anel fenílico sugerem que tal grupo está perpendicular à

superfície da prata. Esta proposta está em acordo com a regra de seleção de superfície a qual considera que os modos perpendiculares à superfície são intensificados (Moskovits e Suh, 1984). A similaridade dos espectros SERS e Raman permite supor que há certa equivalência nas propriedades moleculares quando da protonação do carboxilato e da interação de tal grupo com os átomos de prata.

A similaridade dos espectros SERS obtidos utilizando as radiações excitantes  $\lambda_0 = 532\text{nm}$  e  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$  mostram a reprodutibilidade dos espectros SERS da  $\text{BP}^-$  utilizando o col 4A e a ampla faixa de resposta deste colóide com a radiação excitante.

Os resultados DFT do complexo de superfície  $\text{Ag}_2\text{BP}^-$  construído com dois átomos de prata são apresentados em anexo nesta dissertação. Neste caso, o complexo de superfície calculado com quatro átomos de prata mostrou-se melhor para a atribuição vibracional do espectro SERS.

Na Tabela 16 são apresentados os números de onda das bandas mais intensas no espectro SERS da  $\text{BP}^-$  e as bandas correspondentes do espectro teórico com a atribuição vibracional proposta.

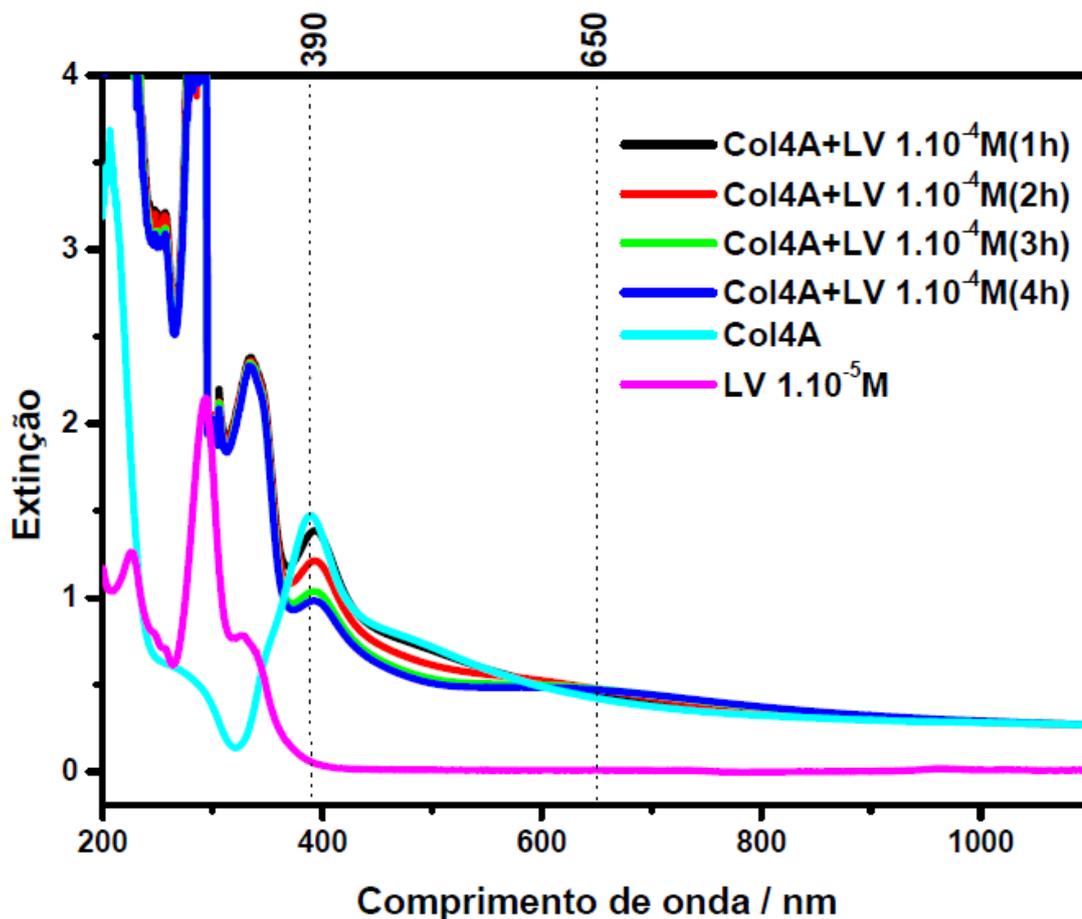
**Tabela 16:** Atribuições vibracionais do espectro SERS da BP<sup>-</sup> obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula interagindo com 4 átomos de prata. Os números de onda estão em cm<sup>-1</sup>

Experimental		Calculado	Atribuição vibracional
$\lambda_0=1064\text{nm}$	$\lambda_0=532\text{nm}$		
-	-	1884	$\nu(\text{C}^2\text{O}^{17})$
1684	1685	1744	$\nu(\text{C}^{14}\text{O}^{16}) + \nu(\text{C}^{10}\text{O}_2)_{\text{as}}$
1655	1655	1738	$\nu_{\text{a}}(\text{C}^{10}\text{O}_2) + \nu(\text{C}^{14}\text{O}^{16})$
1603	1603	1686	$\nu(\text{C}^{19}\text{C}^{20}) + \nu(\text{C}^{22}\text{C}^{23})$
1584	1584	1606	$\nu(\text{C}^{14}\text{N}^{13})$
1440	1440	1410	$\nu(\text{C}^5\text{C}^{10}) + \delta(\text{CH}_3)_{\text{u}}$
1204	1204	1215	$\nu(\text{C}^1\text{N}^{13}) + \delta(\text{CH})_{\text{sk}}$
1032	1032	1067	$\nu(\text{CC})_{\text{Ph}}$
1004	1004	1021	Respiração fenil
945	940	1017	$\delta(\text{N}^{13}\text{C}^{14}\text{O}^{16})$

$\nu$  - estiramento;  $\delta$  - deformação angular; u – sombrinha; Ph – fenil; sk – esqueleto.

#### 4.7.4. Espectros LSPR do col 4A na presença da levofloxacinina

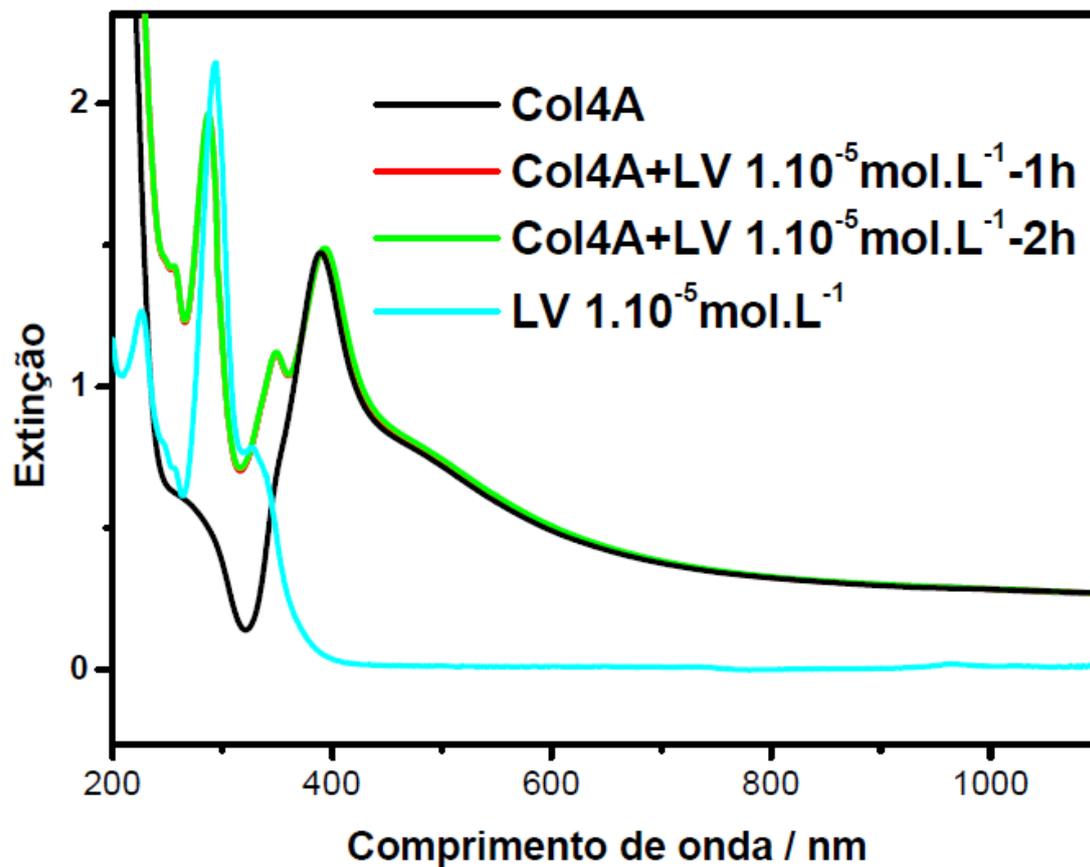
A Figura 32 mostra as modificações da banda LSPR do col 4A na presença da LV  $1.10^{-4}\text{mol.L}^{-1}$  variando-se o tempo de adsorção.



**Figura 32:** Espectros de extinção do col 4A, do col 4A na presença de LV  $1.10^{-4}\text{mol.L}^{-1}$ . Espectro de absorção da LV  $1.10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$ . Caminho óptico: 1cm

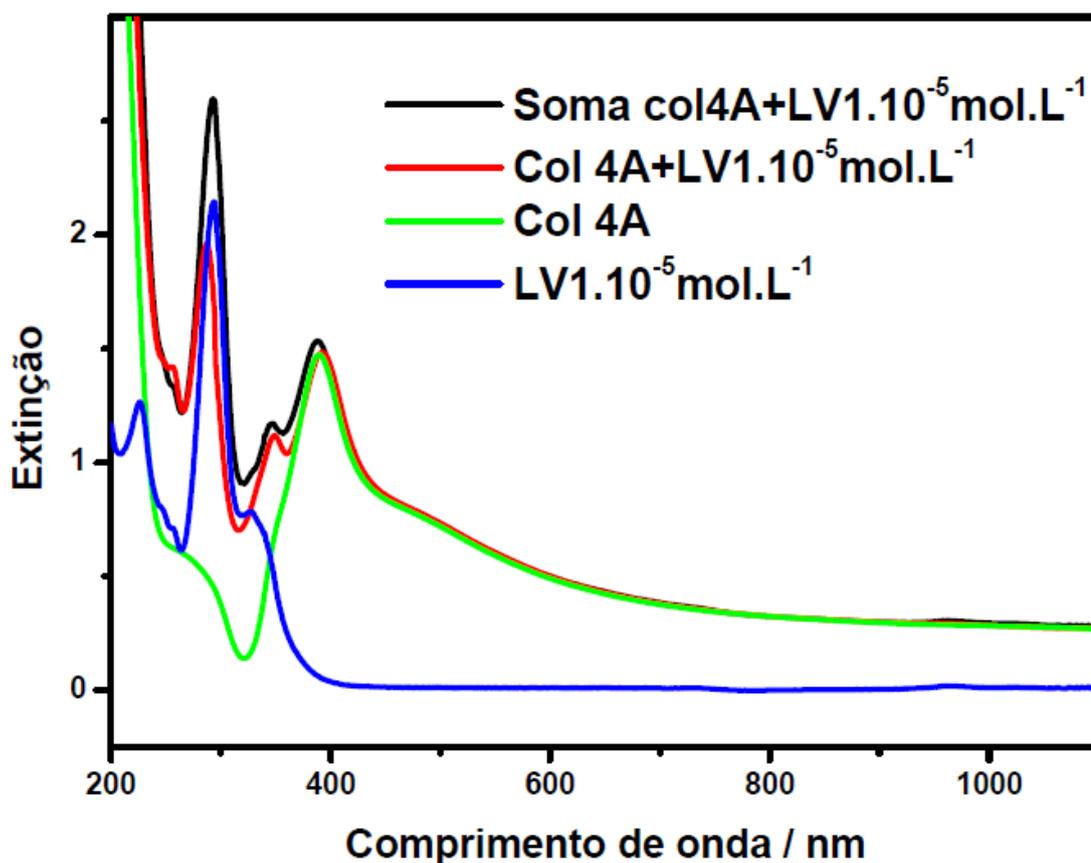
A cinética de adsorção mostra que a banda LSPR do col 4A, em *ca.* 390 nm, na presença de LV  $1,0.10^{-4}\text{mol.L}^{-1}$  se desloca para maiores comprimentos de onda, que está relacionado com o surgimento de outra banda larga em *ca.* 650 nm, atribuída a agregados maiores de AgNPs..

Foram obtidos ainda os espectros de extinção do col 4A na presença da LV  $1.10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$ . A Figura 33 mostra os espectros de extinção do col 4A, do col 4A na presença de LV  $1,0.10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$  e o espectro de absorção da LV  $1,0.10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$ .



**Figura 33:** Espectros de extinção do col 4A, do col 4A na presença de LV 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>  
<sup>1</sup>. Espectro de absorção da LV 1.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>. Caminho óptico: 1cm

A Figura 34 mostra a soma dos espectros de extinção do col 4A e de absorção da LV  $1.10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$  comparados com os obtidos experimentalmente.

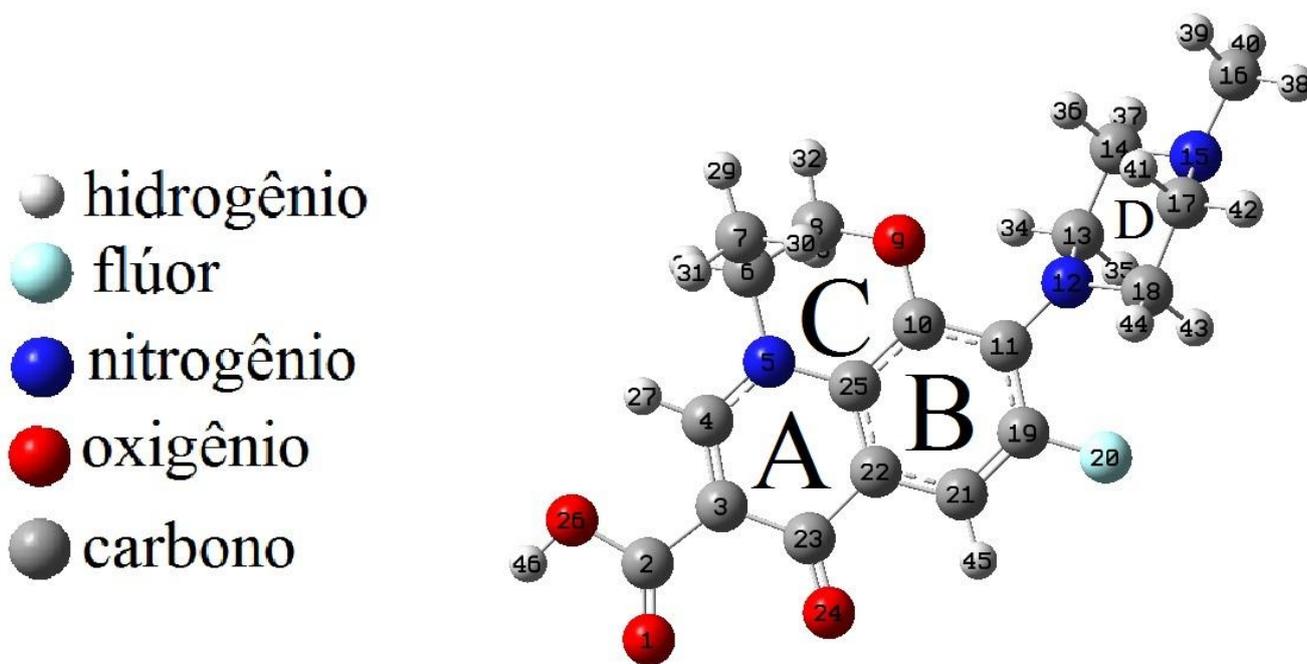


**Figura 34:** Comparação do espectro de extinção do col 4A após adsorção da LV  $1.10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$  com a soma dos espectros de extinção do col 4A e de absorção da LV  $1.10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$ . Caminho óptico: 1,0cm

O monitoramento do col 4A na presença de LV  $1,0.10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$  mostra um deslocamento da banda em *ca.* 388 nm para a região do vermelho, menos pronunciado que o observado a  $1,0.10^{-4}\text{mol.L}^{-1}$ , e sem a formação de agregados maiores. Este comportamento fica evidenciado quando se compara os espectros obtidos experimentalmente com aqueles obtidos com a simples soma dos espectros do col 4A e da solução de LV, pois quando a mistura é feita a linha base apresenta menor espalhamento Rayleigh, devido menor número de partículas pequenas e o máximo da banda LSPR desloca para 393 nm. Pode-se concluir da análise das Figuras 33, 33 e 34, que é possível monitorar este adsorbato até a concentração de  $1,0.10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$ , com controle sobre a cinética de agregação.

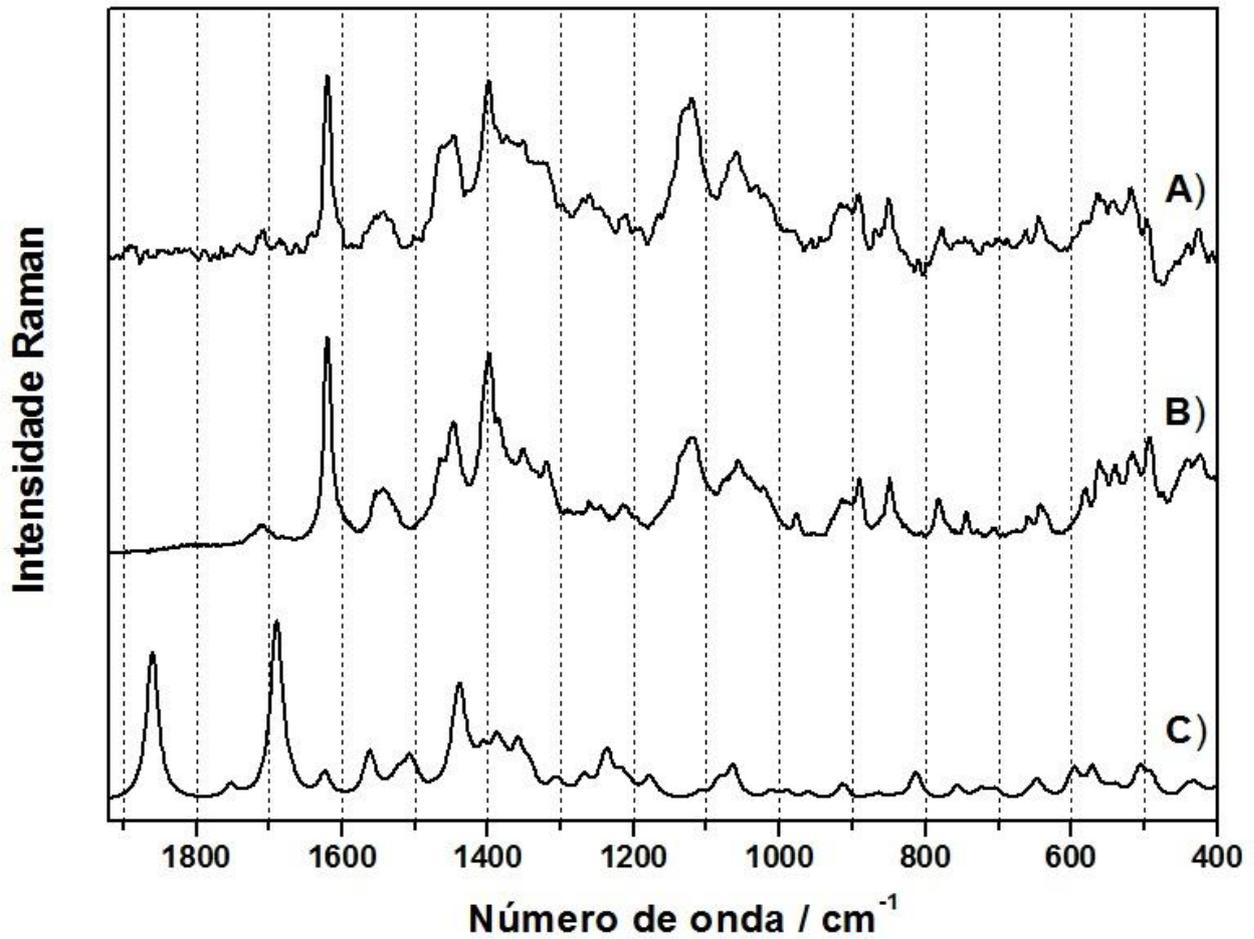
#### 4.7.5. Espectros Raman e SERS da levofloxacin

A Figura 35 mostra a geometria otimizada da LVH obtida através de cálculos DFT com os átomos rotulados que serão utilizados para a discussão das atribuições vibracionais da LVH.



**Figura 35:** Geometria otimizada da LVH

A Figura 36 mostra o espectro Raman da LVH sólida obtido utilizando as radiações excitantes em  $\lambda_0 = 638\text{nm}$  e  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$  e o espectro Raman teórico da LVH. A banda Raman em  $1709\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento CO das carbonilas do ácido carboxílico mostra que o ácido carboxílico é a espécie predominante no estado sólido. A banda Raman em  $1619\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento CC,CN do anel A é a banda mais intensa do espectro Raman, sendo isto devido a alta polarizabilidade deste anel.



**Figura 36:** Espectros Raman da LVH sólida utilizando  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$  (A) e  $\lambda_0=638\text{nm}$  (B); espectro Raman calculado da LVH isolada (C)

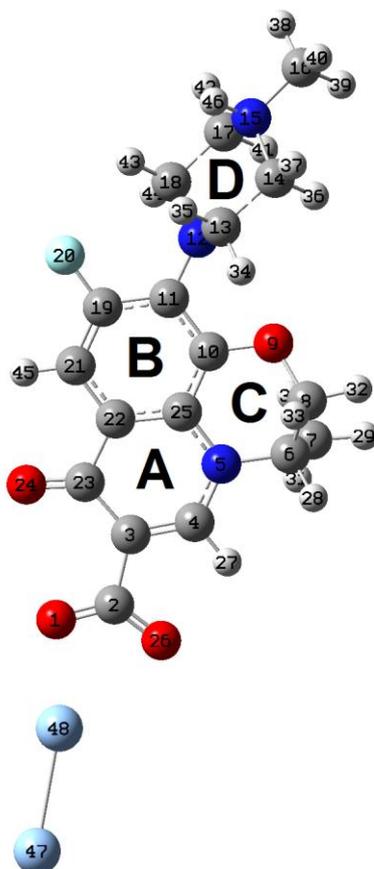
Na Tabela 17 são apresentados os números de onda das bandas mais intensas no espectro Raman da LVH e as bandas correspondentes do espectro teórico com a atribuição vibracional proposta.

**Tabela 17:** Atribuições vibracionais do espectro Raman da LVH obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada. Os números de onda estão em  $\text{cm}^{-1}$ 

			Atribuição vibracional
Experimental	Experimental	Calculado	
$\lambda_0=1064\text{nm}$	$\lambda_0=638\text{nm}$		
1709	1709	1860	$\nu(\text{C}^2\text{O})_{\text{ac}}$
-	-	-	$\nu(\text{C}^2\text{O})_{\text{carb}}$
-	-	1752	$\nu(\text{C}^{23}\text{O}^{24})$
1619	1619	1690	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}}$
1550(sh)	1550(sh)	1670 ou 1624	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}}$ ou $\nu(\text{C}^{23}\text{O}^{24})$
1541	1541	1562	$\nu(\text{C}^{11}\text{N}^{12}) + \nu(\text{CC})_{\text{B}}$
1465	1465	1526	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)_{\text{D}}$
1447	1447	1508	$\delta(\text{CH}_2) + \delta(\text{CH}_3)$
1407(sh)	1407(sh)	1439, 1444	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}} + \delta(\text{CH})$
1397	1397	1437	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}} + \delta(\text{CH})$
1385	1385	1406	$\nu(\text{C}^2\text{C}^3) + \delta(\text{C}^2\text{O})$
1351	1351	1386	$\nu(\text{C}^2\text{C}^3) + \nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}}$
1319	1319	1359	$\nu(\text{CC})_{\text{B}} + \delta(\text{CH})$
1215	1215	1235	$\delta(\text{CH})_{\text{A,B}} + \delta(\text{OH})$
1057	1057	1064	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B,C,D}}$
1118	1118	1176	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{C}} + \nu(\text{C}^{16}\text{N}^{15}) + \delta(\text{CH})$
1069	1069	1082	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B,C}} + \delta(\text{CH}_3)$
1055	1055	1064	deformação sk
890	890	913	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B,C}} + \delta(\text{C}^{23}\text{O}^{24}) + \delta(\text{CH})$
849	849	864	deformação sk
784	784	813	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{D}}$
744	744	756	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B,C}} + \nu(\text{CC,CO})_{\text{C}}$

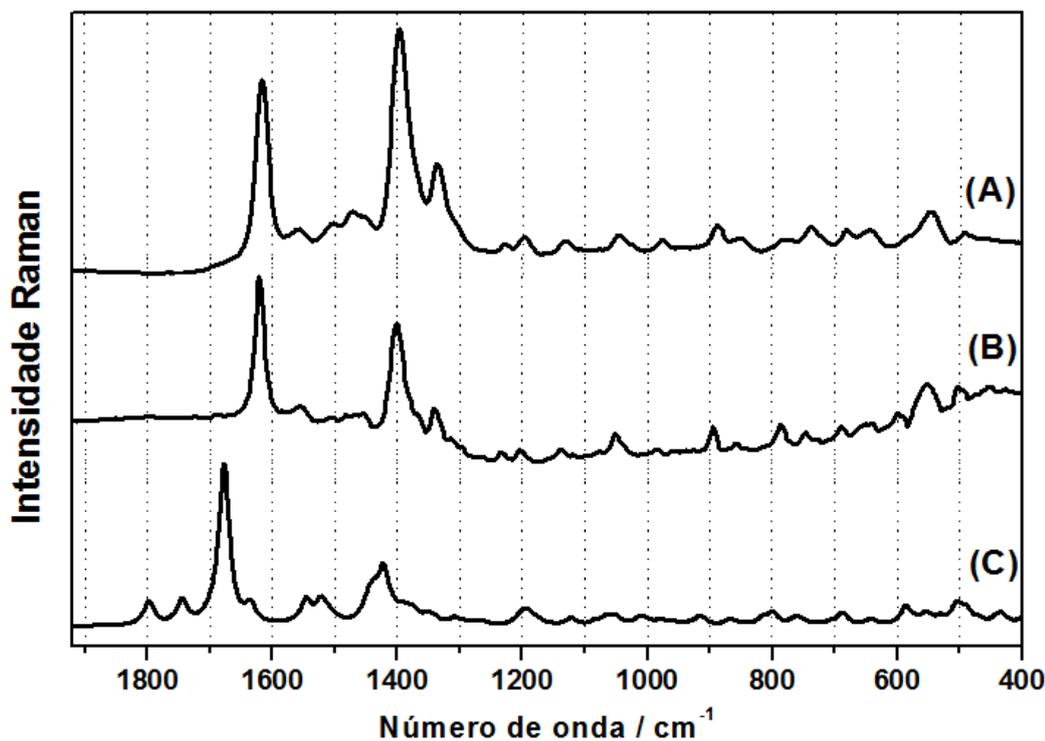
$\nu$ -estiramento;  $\delta$ -deformação angular; ac -ácido carboxílico; carb-carboxilato; sk - esqueleto; A,B,C,D anéis rotulados na Figura 35.

A figura 37 mostra o modelo do complexo de superfície  $\text{Ag}_2\text{LVH}^\pm$ , otimizado através de cálculos DFT, utilizado na atribuição vibracional do espectro SERS. A LV tem dois valores de  $\text{pK}_a$ : 5,5 envolvendo a desprotonação do ácido carboxílico, e 7,4 envolvendo a desprotonação do grupo amônio no  $\text{N}^{15}$  ( $\text{LVH}_2^+ \leftrightarrow \text{LVH}^\pm \leftrightarrow \text{LV}^-$ ) (Hirano *et al.*, 2006). A espécie predominante no pH da suspensão das AgNPs é a espécie zwitteriônica.



**Figura 37:** Geometria otimizada da  $\text{LVH}^\pm$  interagindo com dois átomos de prata

A Figura 38 mostra os espectros SERS da  $\text{LVH}^\pm$   $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  obtidos utilizando  $\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$  e  $\lambda_0 = 638 \text{ nm}$  e o espectro teórico do complexo  $\text{Ag}_2\text{LVH}^\pm$ . A intensa banda SERS em  $1622 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento CC,CN dos anéis A,B. As intensas bandas SERS em  $1402$  e  $1368 \text{ cm}^{-1}$ , são atribuídas ao estiramento  $\text{C}^2\text{C}^3$  perpendicular à superfície metálica da prata. (Moskovits, 1982; Moskovits e Suh, 1984) Tal intensificação sugere que o carboxilato é o sítio de adsorção da  $\text{LVH}^\pm$  sobre colóide de prata.



**Figura 38:** Espectros SERS da  $\text{LVH}^{\pm}$   $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  obtidos utilizando colóide de prata (col 4A), com excitação em  $\lambda_0 = 638 \text{ nm}$  (A) e  $\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$  (B); espectro Raman calculado do complexo  $\text{Ag}_2\text{LVH}^{\pm}$  (C)

Na Tabela 18 são apresentados os números de onda das bandas mais intensas no espectro SERS da  $\text{LVH}^{\pm}$  e as bandas correspondentes do espectro teórico com a atribuição vibracional proposta.

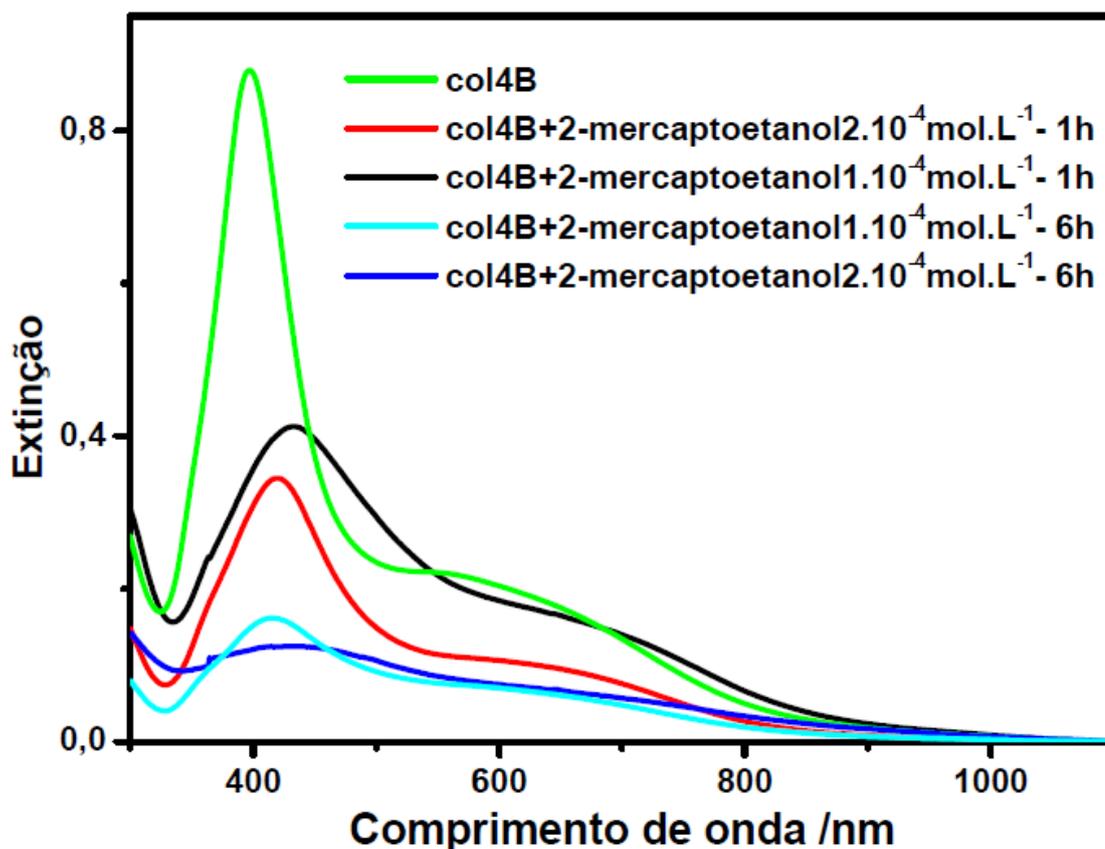
**Tabela 18:** Atribuições vibracionais do espectro SERS da LVH<sup>±</sup> obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula interagindo com 2 átomos de prata. Os números de onda estão em cm<sup>-1</sup>

			Atribuição vibracional
Experimental	Experimental	Calculado	
$\lambda_0=1064\text{nm}$	$\lambda_0=638\text{nm}$		
-	-	1744	$\nu(\text{C}^2\text{O})_{\text{carb}}$
-	-	1797	$\nu(\text{C}^{23}\text{O}^{24})$
1622	1622	1678	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}}$
1555	1555	1635	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}}$ ou $\nu(\text{C}^{23}\text{O}^{24})$
-	-	1546	$\nu(\text{C}^{11}\text{N}^{12}) + \nu(\text{CC})_{\text{B}}$ $\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)_{\text{D}}$
1450	1450	1523	$\delta(\text{CH}_2) + \delta(\text{CH}_3)$ $\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}} + \delta(\text{CH})$
-	-	1438	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}} + \delta(\text{CH})$
1402	1402	1423	$\nu(\text{C}^2\text{C}^3) + \delta(\text{C}^2\text{O})$
1368	1368	1377	$\nu(\text{C}^2\text{C}^3) + \nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B}}$
1340	1340	1340	$\nu(\text{CC})_{\text{B}} + \delta(\text{CH})$
-	-	-	$\delta(\text{CH})_{\text{A,B}} + \delta(\text{OH})$
1051	1051	-	$\nu(\text{CC,CN})_{\text{A,B,C,D}}$

$\nu$ -estiramento;  $\delta$ -deformação angular; ac -ácido carboxílico; carb-carboxilato; sk - esqueleto; A,B,C,D anéis rotulados na Figura 37.

#### 4.7.6. Espectro LSPR do col 4A na presença do 2-mercaptoetanol

O estudo da cinética de agregação do col 4 na presença de 2-mercaptoetanol foi feito para obtenção dos espectros SERS da rifampicina, devido ao fato dessa molécula não ter adsorvido sobre o colóide de prata. O 2-mercaptoetanol promoveu a interação com a rifampicina através de ligação de hidrogênio e com o substrato metálico através do átomo de enxofre. A Figura 39 mostra os espectros LSPR obtidos com a evolução do tempo de adsorção do 2-mercaptoetanol nas concentrações  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  sobre o col 4B.



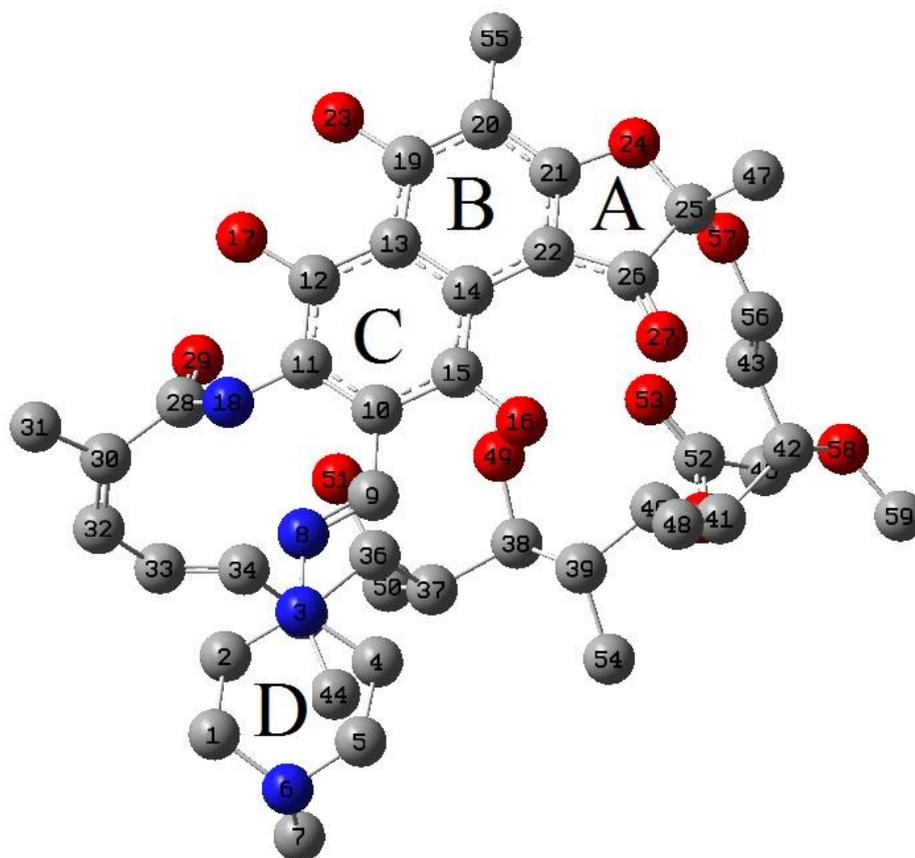
**Figura 39:** Estudo da cinética de agregação do col 4B na presença de 2-mercaptoetanol  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

A Figura 39 mostra que para a concentração  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  a agregação do colóide é bem mais rápida, mostrando uma larga distribuição de tamanhos depois de 6h. Para a concentração  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  a cinética é bem mais lenta, mostrando uma distribuição de tamanhos mais estreita após 6h, sendo esta a escolhida para a obtenção dos espectros SERS.

#### 4.7.7. Espectros Raman e SERS da rifampicina

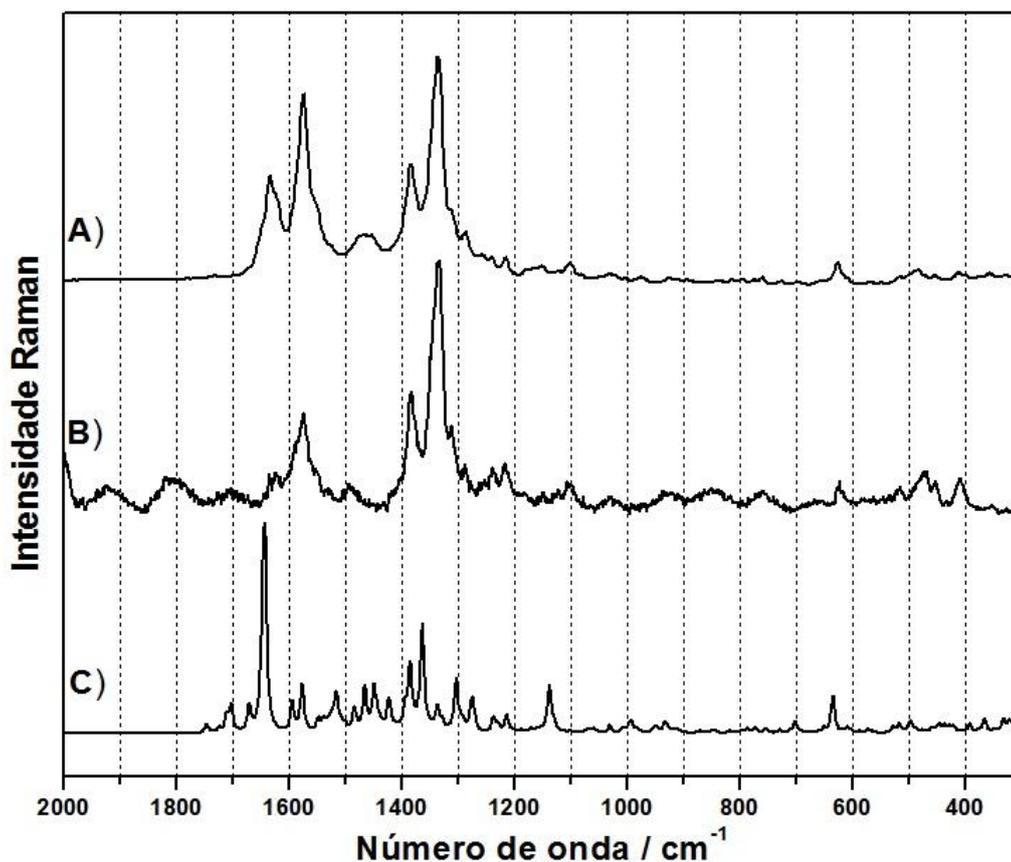
O espectro SERS da RP foi muito difícil de ser obtido. A adsorção da RP sobre superfície de prata só foi possível quando modificou-se a superfície metálica com 2-mercaptoetanol, que interage com a prata pelo átomo de enxofre e com a RP por ligação de hidrogênio.

A Figura 40 mostra a geometria otimizada da RP obtida através de cálculos DFT com os átomos rotulados que serão utilizados para a discussão das atribuições vibracionais da RP.



**Figura 40:** Geometria otimizada da RP. Os átomos de hidrogênio foram omitidos

A Figura 41 mostra o espectro Raman da RP sólida obtido utilizando a radiação excitante  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ , o espectro da solução de RP  $1,0 \cdot 10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$  obtido utilizando a radiação excitante  $\lambda_0 = 638\text{nm}$  e o espectro Raman calculado da RP isolada.



**Figura 41:** Espectro Raman da RP sólida  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ (A). Espectro Raman da RP  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$   $\lambda_0 = 638\text{nm}$  (B). Espectro Raman calculado da RP isolada (C)

As bandas em 1633, 1576, 1385 e 1335  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas aos estiramentos CC dos anéis A, B e C, além das variações de ângulo das hidroxilas  $\text{O}^{16}\text{H}$  e  $\text{O}^{17}\text{H}$ , respectivamente são as banda mais intensas no espectro Raman da rifampicina isolada utilizando-se a radiação excitante  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$ . As diferenças nas intensidades relativas entre os espectros obtidos nas radiações excitantes  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$  e  $\lambda_0 = 638\text{nm}$ , mostram uma pré-ressonância, quando se utilizou a radiação excitante  $\lambda_0 = 638\text{nm}$ . O efeito Raman ressonante é um acoplamento vibrônico que ocorre quando a energia da radiação excitante se aproxima ou coincide com uma banda de transição eletrônica permitida da espécie em estudo, fazendo com que haja um aumento substancial na intensidade das bandas vibracionais acopladas com o grupo cromóforo.

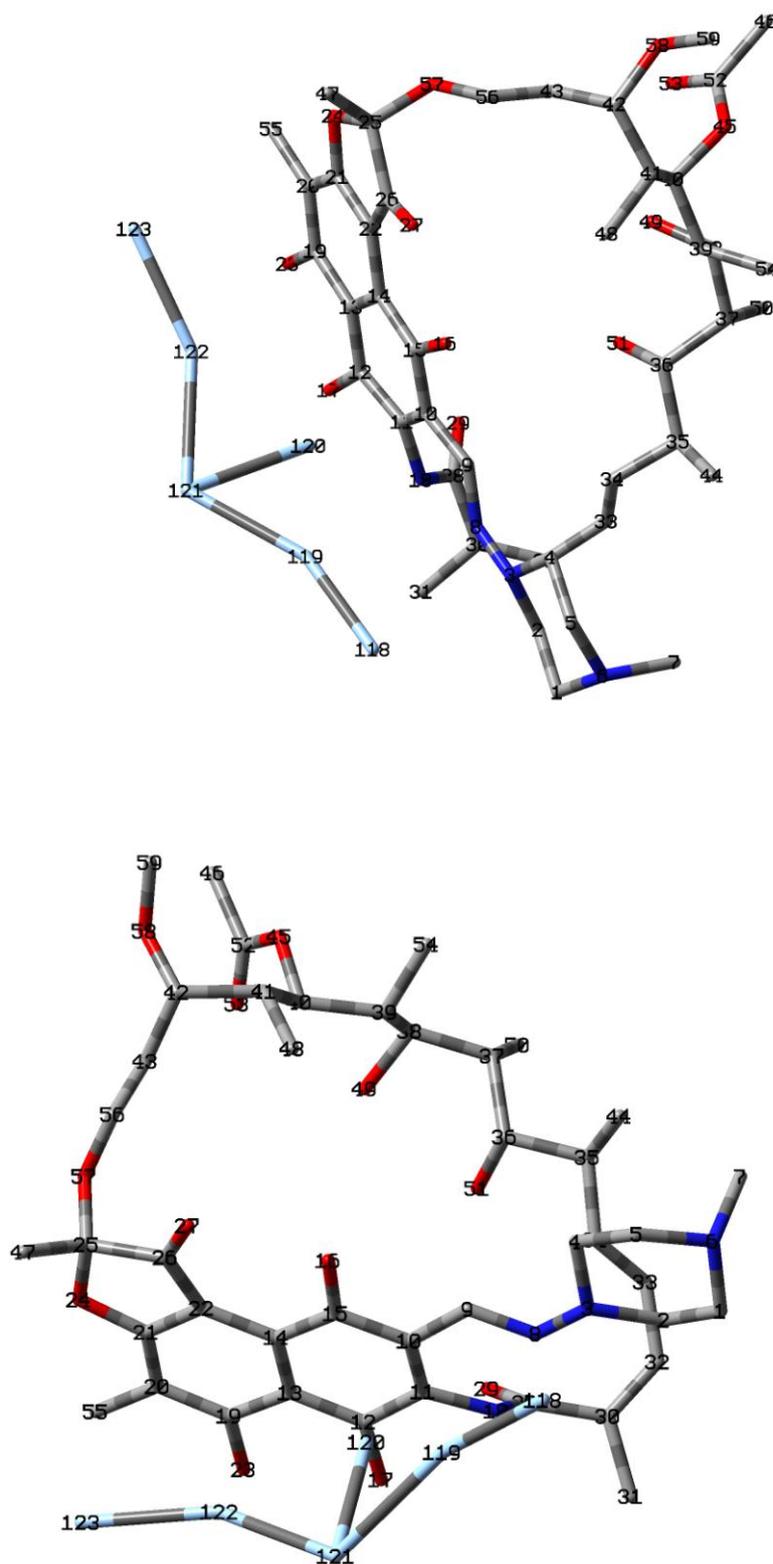
Na Tabela 19 são apresentados os números de onda das bandas mais intensas no espectro Raman da RP e as bandas correspondentes do espectro teórico com a atribuição vibracional proposta.

**Tabela 19:** Atribuições vibracionais do espectro Raman da RP obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada. Os números de onda estão em  $\text{cm}^{-1}$ 

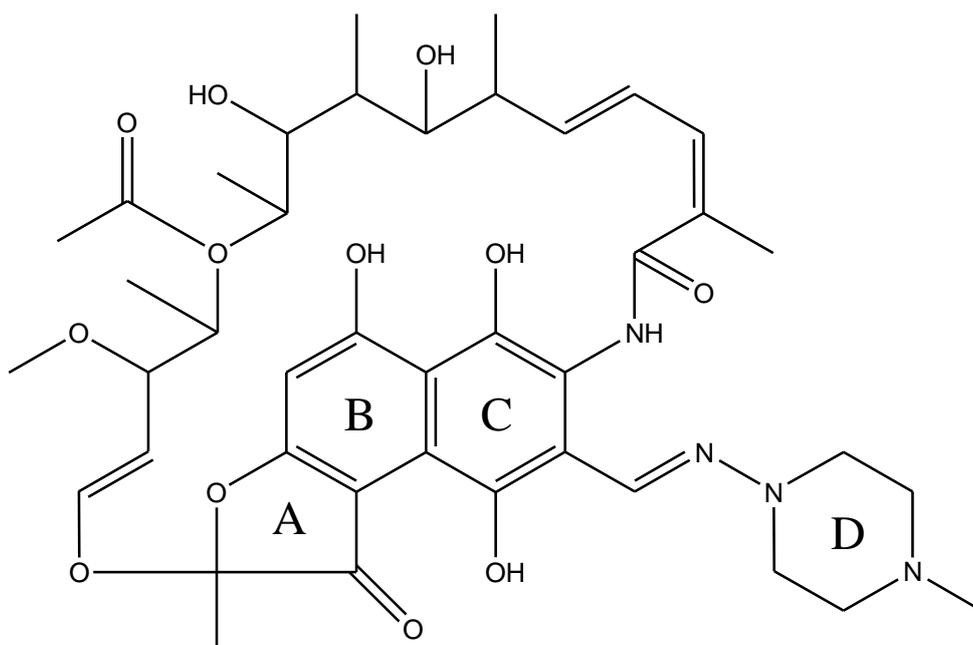
Experimental		Calculado	Atribuição vibracional
$\lambda_0= 1064\text{nm}$	$\lambda_0= 638\text{nm}$		
1633	1625	1646	$\nu (\text{C}^9\text{N}^8 + \text{C}^{20}\text{C}^{21} + \text{C}^{21}\text{C}^{22} + \text{C}^{20}\text{C}^{19}) + \delta$ $(\text{C}^9\text{H} + \text{O}^{16}\text{H} + \text{O}^{23}\text{H} + \text{N}^{18}\text{H})$
1576	1575	1593	$\nu (\text{CC} (\text{anel B,C}) + \text{C}^{11}\text{N}^{18}) + \delta (\text{N}^{18}\text{H} +$ $\text{O}^{16}\text{H}) + \delta (\text{C}^{55}\text{H}_3)$
1550 (sh)	1556 (sh)	1576	$\nu (\text{CC} (\text{anel B,C}) + \text{C}^{11}\text{N}^{18} + \text{C}^{28}\text{N}^{18}) + \delta$ $(\text{N}^{18}\text{H}) + \delta (\text{C}^{55}\text{H}_3)$
1470	1490	1483	$\nu (\text{CC} (\text{anel B,C}) + \text{C}^{15}\text{O}^{16} + \text{C}^{12}\text{O}^{17} +$ $\text{C}^{19}\text{O}^{23}) + \delta (\text{O}^{16}\text{H} + \text{C}^9\text{H})$
1455	-	1465	$\nu (\text{CC} (\text{anel B,C}) + \text{C}^{12}\text{O}^{17}) + \delta (\text{O}^{23}\text{H})$
1385	1385	1384	$\nu (\text{CC} (\text{anel C}) + \text{C}^{10}\text{C}^9) + \omega (\text{C}^2\text{H}_2 +$ $\text{C}^1\text{H}_2) + \delta (\text{O}^{17}\text{H})$
1335	1333	1362	$\nu (\text{CC} (\text{anel A, B, C}) + \text{C}^{21}\text{O}^{24}) + \delta (\text{O}^{16}\text{H}$ $+ \text{O}^{17}\text{H})$
1238	1238	1236	$\nu (\text{C}^{25}\text{C}^{47} + \text{C}^{13}\text{C}^{14} + \text{C}^{12}\text{O}^{17} + \text{C}^{28}\text{N}^{18}\text{C}^{30} +$ $\text{C}^{15}\text{O}^{16})$
1216	1216	1213	$\nu (\text{C}^{21}\text{O}^{24} + \text{C}^{25}\text{O}^{24} + \text{C}^{56}\text{O}^{57}) + \delta (\text{anel B,}$ $\text{C}) + \text{u} (\text{C}^{55}\text{H}_3 + \text{C}^{47}\text{H}_3)$
1101	1102	1137	$\nu (\text{N}^3\text{N}^8) + \delta (\text{anel B, C, D}) + \nu (\text{C}^9\text{C}^{10}) +$ $\tau (\text{C}^1\text{H}_2 + \text{C}^2\text{H}_2)$
625	623	634	$\gamma (\text{C}^{31}\text{C}^{30}\text{C}^{32}) + \text{esqueleto}$

$\nu$  - estiramento;  $\delta$  - deformação angular;  $\gamma$  - fora do plano;  $\text{u}$  - sombrina;  $\tau$  - torção;  $\omega$  - abano; A,B,C,D – anéis rotulados na Figura 45;

A Figura 42 mostra o modelo do complexo de superfície  $\text{Ag}_6\text{RP}$ , otimizado através de cálculos DFT, utilizado na atribuição vibracional do espectro SERS.



**Figura 42:** Geometria otimizada da RP interagindo com seis átomos de prata

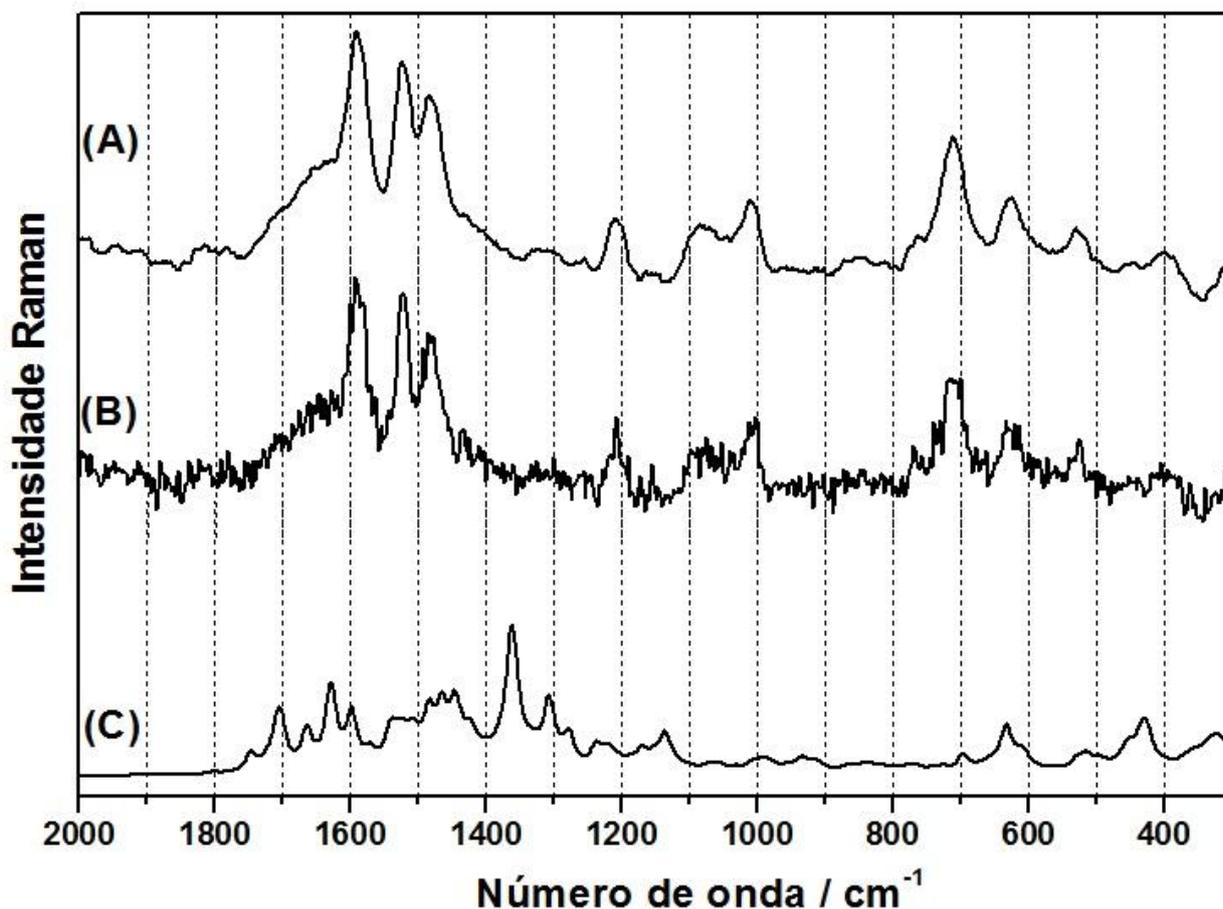


**Figura 43:** Fórmula estrutural da RP

Para melhor visualizar a geometria otimizada a fórmula estrutural da RP é apresentada na Figura 43.

A Figura 44 mostra o espectro SERS da RP  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  obtido utilizando  $\lambda_0 = 638 \text{ nm}$  e o espectro teórico do complexo de prata. As intensas bandas SERS em  $1582$ ,  $1520$  e  $1478 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas principalmente aos estiramentos CC dos anéis B, C, permitem inferir que esta região da molécula está mais próxima da superfície. Esta hipótese é reforçada pelo modelo do complexo de superfície. A impossibilidade de obtermos o espectro SERS da RP sem a modificação da superfície de prata pelo 2-mercaptoetanol, permite inferir que o modificador de superfície interage com a superfície da prata pelo átomo de enxofre e com a RP por ligação de hidrogênio com os átomos de oxigênio das hidroxilas. No modelo de complexo de superfície, a menor distância metal adsorbato ocorre entre o átomo  $\text{Ag}^{120}$  e o átomo  $\text{C}^{12}$ , que pode ser associada a uma interação do tipo van der Waals, que é lábil e explica a dificuldade de estudar-se a adsorção da RP. Mas este modelo permitiu uma atribuição do espectro SERS adequada, o que sugere que as interações entre a RP e a prata, na presença do 2-mercaptoetanol, levam à adsorção da molécula na superfície metálica pelos mesmos sítios de interação. As diferenças observadas entre os espectros Raman e SERS da RP são devidas à geometria de adsorção, que envolve as interações entre o 2-mercaptoetanol, a rifampicina e a superfície da prata. Na atribuição do espectro SERS

as bandas em 400, 629, 718 e 1008  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas ao estiramento CS e ao estiramento CCO devidas ao modificador de superfície.



**Figura 44:** Espectro SERS da RP  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$  obtido utilizando coloide de prata com 2-mercaptoetanol,  $\lambda_0 = 638 \text{nm}$  e função *smoothing* modo *adjacent average* com 10 pontos para melhor clareza do espectro SERS (A). Espectro SERS da RP  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$  obtido utilizando coloide de prata (col 4A) com 2-mercaptoetanol e  $\lambda_0 = 638 \text{nm}$  (B). Espectro Raman calculado do complexo  $\text{Ag}_6\text{RP}$ (C)

Na Tabela 20 são apresentados os números de onda das bandas mais intensas no espectro SERS da RP e as bandas correspondentes do espectro teórico com a atribuição vibracional proposta.

**Tabela 20:** Atribuições vibracionais do espectro SERS da RP obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula interagindo com 6 átomos de prata. Os números de onda estão em  $\text{cm}^{-1}$

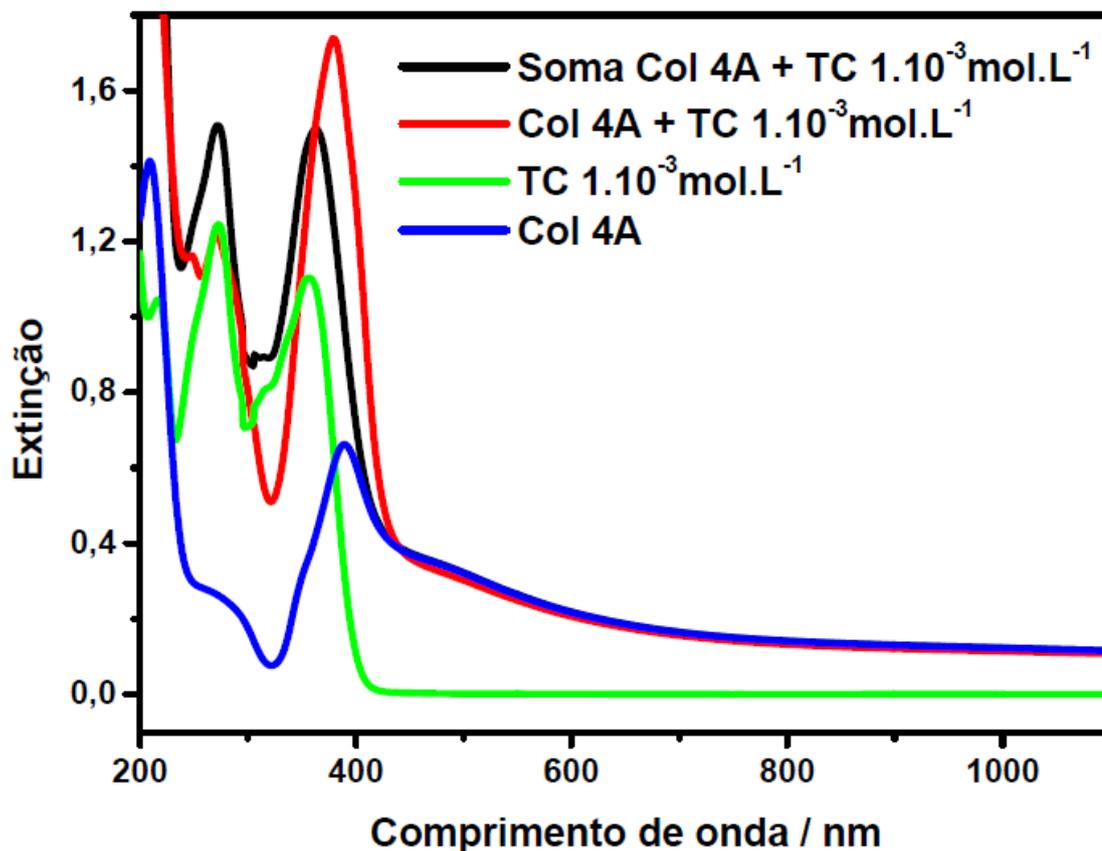
		Atribuição vibracional
Experimental	Calculado	
$\lambda_0=638$		
1605	1627	$\nu(\text{C}^9\text{N}^8) + \nu(\text{C}^{11}\text{C}^{12})$ anelC
1582	1597	$\nu(\text{CC}(\text{anel B,C}) + \text{C}^{11}\text{N}^{18}) + \delta(\text{N}^{18}\text{H} + \text{O}^{16}\text{H})$ $+ \delta(\text{C}^{55}\text{H}_3)$
1520	1541	$\nu(\text{CC}(\text{anel B,C}) + \text{C}^{11}\text{N}^{18} + \text{C}^{28}\text{N}^{18}) + \delta$ $(\text{N}^{18}\text{H}) + \delta(\text{C}^{55}\text{H}_3)$
1478	1483	$\nu(\text{CC}(\text{anel B,C}) + \text{C}^{15}\text{O}^{16} + \text{C}^{12}\text{O}^{17} + \text{C}^{19}\text{O}^{23})$ $+ \delta(\text{O}^{16}\text{H} + \text{C}^9\text{H})$
1208	1276	$\nu(\text{CC}(\text{anel A,B,C}))$
525	517	$\gamma(\text{CCC}(\text{anelC}))$

$\nu$  - estiramento;  $\delta$  - deformação angular;  $\gamma$  - fora do plano; .A,B,C,D – anéis rotulados na Figura 45

Como discutido anteriormente, a RP interage com a superfície da prata por ligação de van der Waals intensificando os modos normais associados aos anéis aromáticos B e C. Foi obtido ainda, por outra aluna do grupo, o espectro SERS da RP sobre superfície de ouro com e sem o modificador de superfície 2-mercaptoetanol, onde verificamos que a adsorção também se dá por interação de van der Waals intensificando principalmente os modos vibracionais dos anéis B e C.

#### 4.7.8. Espectros LSPR do col 4A na presença da tetraciclina

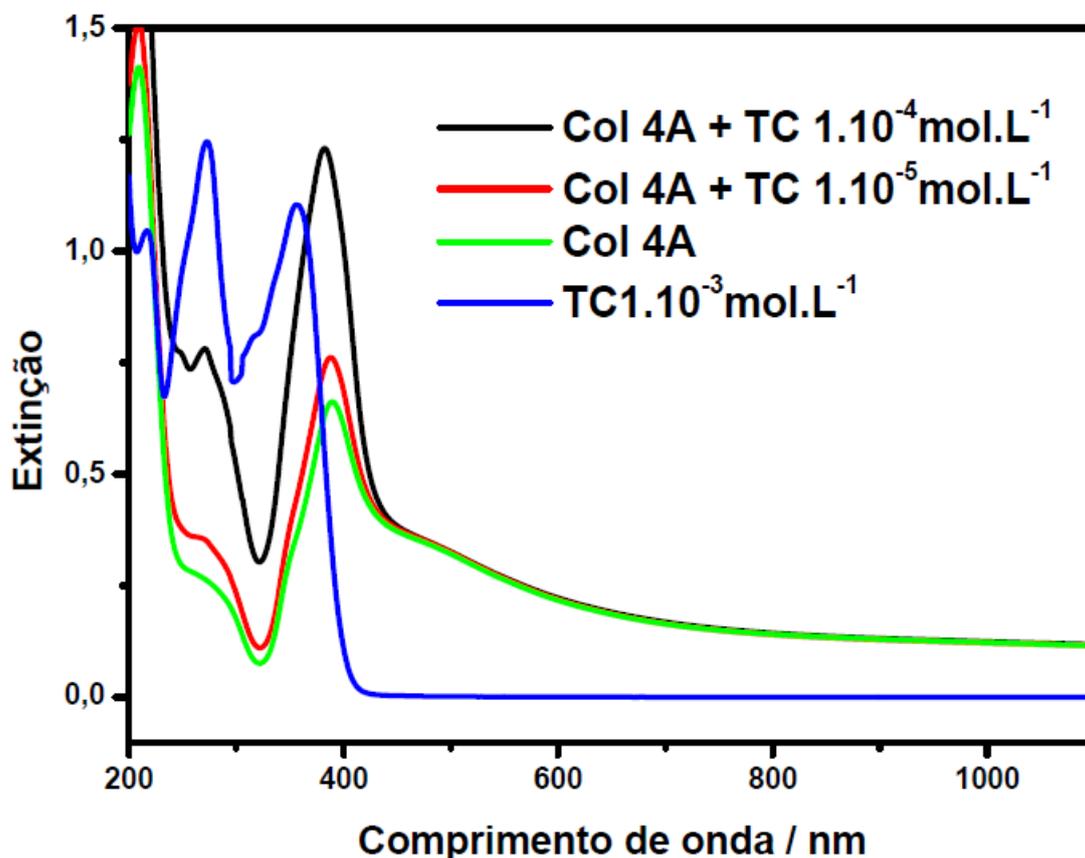
A Figura 45 mostra as modificações no formato da banda LSPR do col 4A na presença da TC,  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  quando comparadas com a soma dos espectros do coloide puro e da solução de TC na mesma concentração da mistura.



**Figura 45:** Comparação do espectro de extinção do col 4A após adsorção da TC  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  com a soma dos espectros do col 4A e da TC  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Caminho óptico: 0,1cm

O monitoramento da banda LSPR, observada em *ca.* 379 nm na mistura do coloide com a solução de TC, e em *ca.* 362 nm na soma simples dos espectros, mostra que houve um processo de agregação, inferido pela diminuição da linha base e o deslocamento do máximo para o vermelho. Este processo envolveu apenas as partículas muito pequenas, pois o perfil espectral na região acima de 500 nm não modificou significativamente.

Foram obtidos ainda os espectros de extinção do col 4A na presença da TC nas concentrações  $1.10^{-4}$  e  $1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> para o monitoramento das mudanças na banda LSPR do coloide (Figura 46).

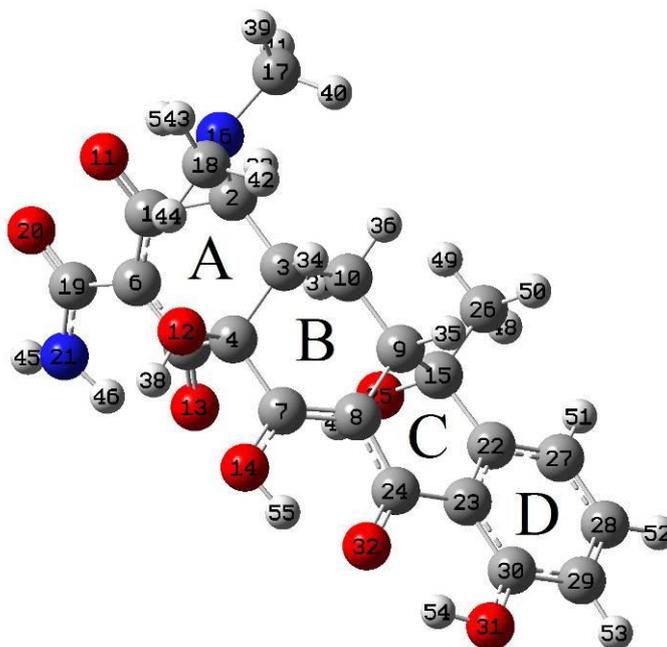


**Figura 46:** Espectros de extinção do col 4, do col 4 na presença de TC  $1.10^{-4}$  e  $1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. Espectro de absorção da TC  $1.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. Caminho óptico: 0,1cm

Podemos concluir que não há mudanças significativas na distribuição de tamanhos das NPs do Col 4A na presença da TC na concentração de  $1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, e o processo de agregação observado na concentração de  $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> é semelhante ao observado quando a TC estava na concentração de  $1.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>.

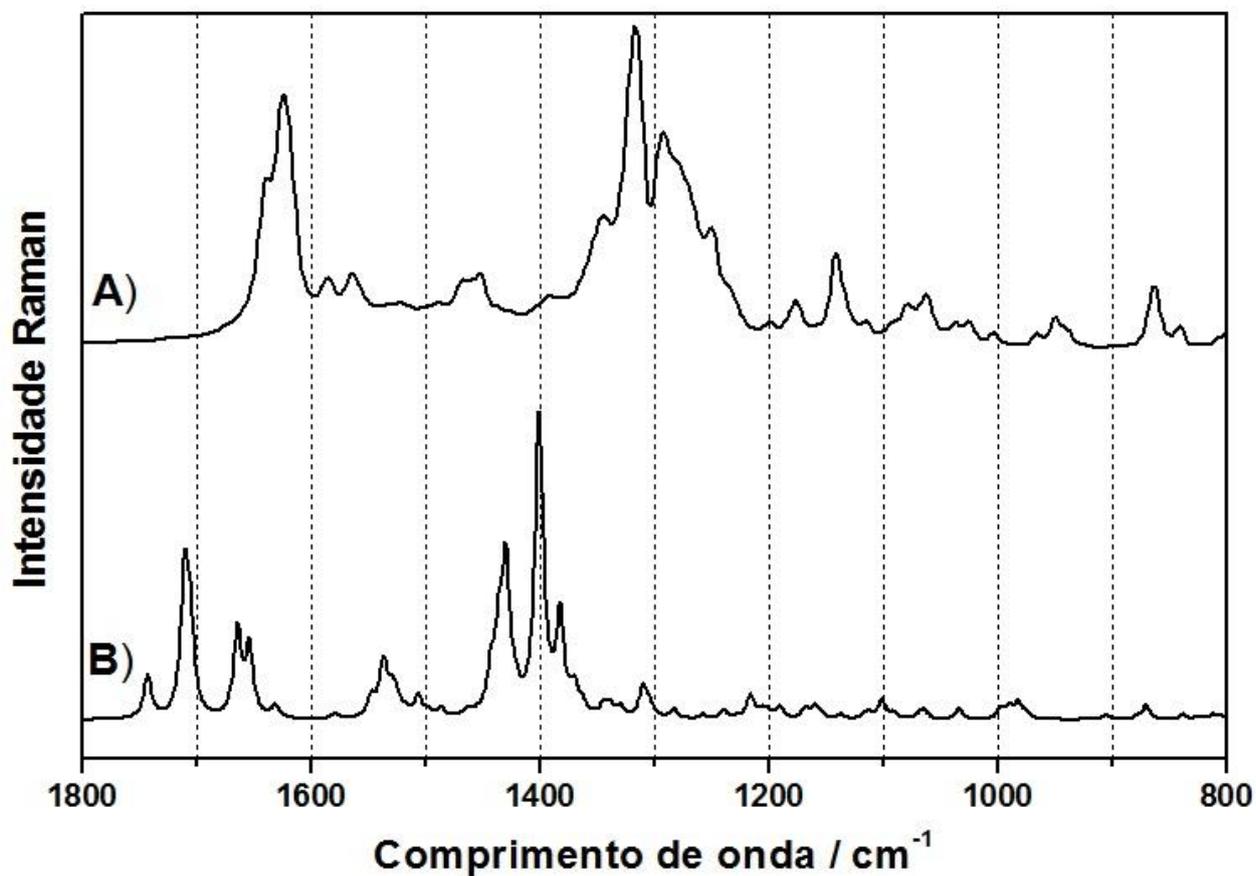
#### 4.7.9. Espectros Raman e SERS da tetraciclina

A Figura 47 mostra a geometria otimizada da TC como uma espécie zwitteriônica, obtida através de cálculos DFT com os átomos rotulados que serão utilizados para a discussão das atribuições vibracionais dos espectros SERS. A TC possui três valores de  $pK_a$ : 3,3 que envolve a desprotonação da hidroxila do átomo  $O^{11}$ , 7,7 que envolve a desprotonação da hidroxila do átomo de  $O^{14}$  e 9,7 que envolve a desprotonação do grupo amônio do  $N^{16}$  ( $TCH_3^+ \leftrightarrow TCH_2^\pm \leftrightarrow TCH^- \leftrightarrow TC^{2-}$ ) (Leypold *et al.*, 2003). A espécie predominante no pH da suspensão é a  $TCH_2^\pm$ . Os cálculos DFT de todas as espécies da TC isolada estão representados em anexo dessa dissertação, junto com os dois complexos de prata construído com a espécie  $TCH_2^\pm$ , seguidos da justificativa para a escolha do modelo do complexo de superfície.



**Figura 47:** Geometria otimizada da  $TCH_2^\pm$

A Figura 48 mostra o espectro Raman da  $TCH_2^\pm$  sólida obtido utilizando a radiação excitante  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$  e o espectro Raman calculado da TC isolada.



**Figura 48:** Espectro Raman da TCH<sub>2</sub><sup>±</sup> sólida  $\lambda_0 = 1064\text{nm}$  (A). Espectro Raman calculado da TCH<sub>2</sub><sup>±</sup> isolada (B)

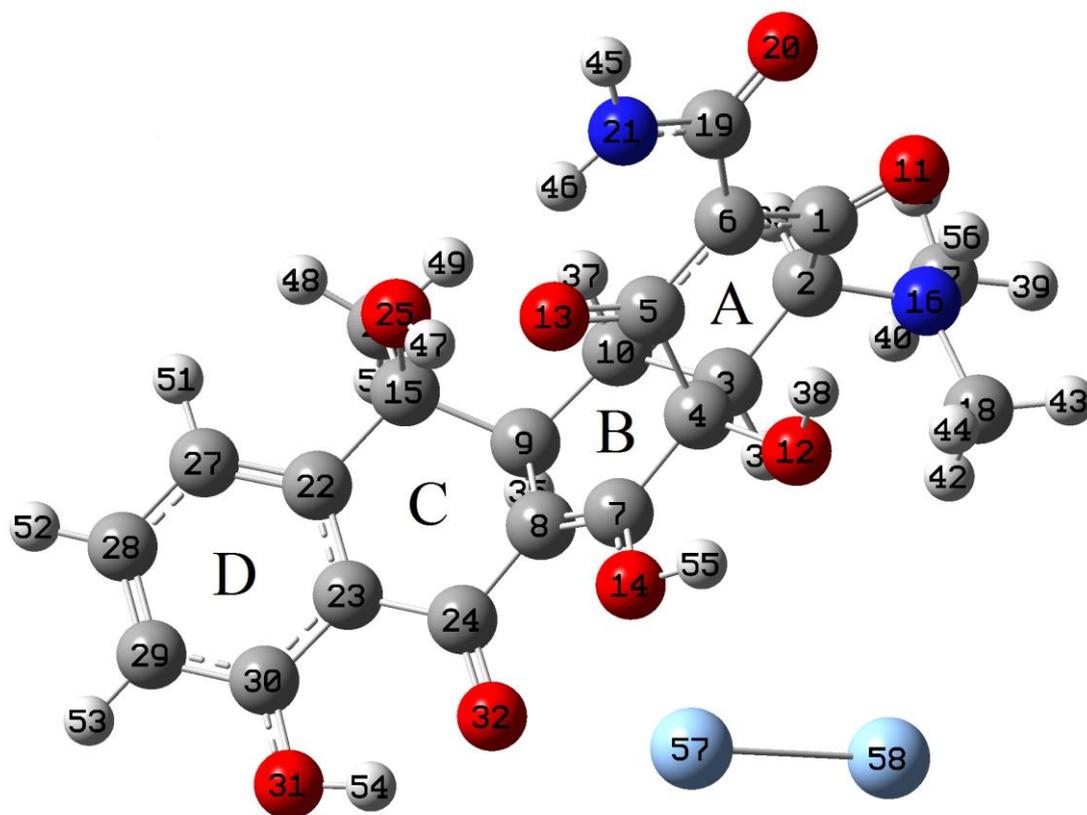
Na Tabela 21 são apresentados os números de onda das bandas mais intensas no espectro Raman da TCH<sub>2</sub><sup>±</sup> e as bandas correspondentes do espectro teórico com a atribuição vibracional proposta.

**Tabela 21:** Atribuições vibracionais do espectro Raman da  $\text{TCH}_2^\pm$  obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula isolada. Os números de onda estão em  $\text{cm}^{-1}$ 

Experimental	Calculado	Atribuição vibracional
$\lambda_0 = 1064\text{nm}$		
1638sh	1741	$\nu(\text{C}^5\text{O}^{13}, \text{C}^1\text{O}^{11})_s + \nu(\text{C}^{19}\text{O}^{20})$
1624	1710	$\nu(\text{C}^5\text{O}^{13}, \text{C}^1\text{O}^{11}, \text{C}^{19}\text{O}^{20}) + \delta(\text{NH}_2) + \delta(\text{O}^{14}\text{H})$
1584	1664	$\nu(\text{CC})_D + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32})$
1562	1654	$\nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32}) + \nu(\text{CC})_D$
-	1538	$\delta(\text{C}^{17}\text{H}_3) + \delta(\text{C}^{18}\text{H}_3)$
-	1535	$\nu(\text{CC}, \text{CO})_{B,C,D}$
1464	1463	$\nu(\text{CC})_C + \nu(\text{CC})_A + \nu(\text{C}^{15}\text{C}^{26})$
1344	1430	$\nu(\text{CC})_{A,B,C,D} + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32}) + \nu(\text{C}^6\text{C}^{19})$
1316	1400	$\nu(\text{CC}, \text{CO})_{A,B,C,D}$
1292	1382	$\nu(\text{CC})_{A,B,C,D} + \nu(\text{C}^{30}\text{O}^{31}) + \nu(\text{C}^1\text{O}^{11})$
1247	1310	$\nu(\text{CC})_{C,D} + \nu(\text{C}^7\text{O}^{14})$
1139	?	?
864	870	$\nu(\text{C}^6\text{C}^{19}) + \nu(\text{CC})_{B,C,D}$

$\nu$  - estiramento,  $\delta$  - deformação angular, s – simétrico, as – assimétrico, A,B,C,D – anéis rotulados na Figura 47.

A Figura 49 mostra o modelo do complexo de superfície  $\text{Ag}_2\text{TCH}_2^\pm$ , otimizado através de cálculos DFT, utilizado na atribuição vibracional do espectro SERS.

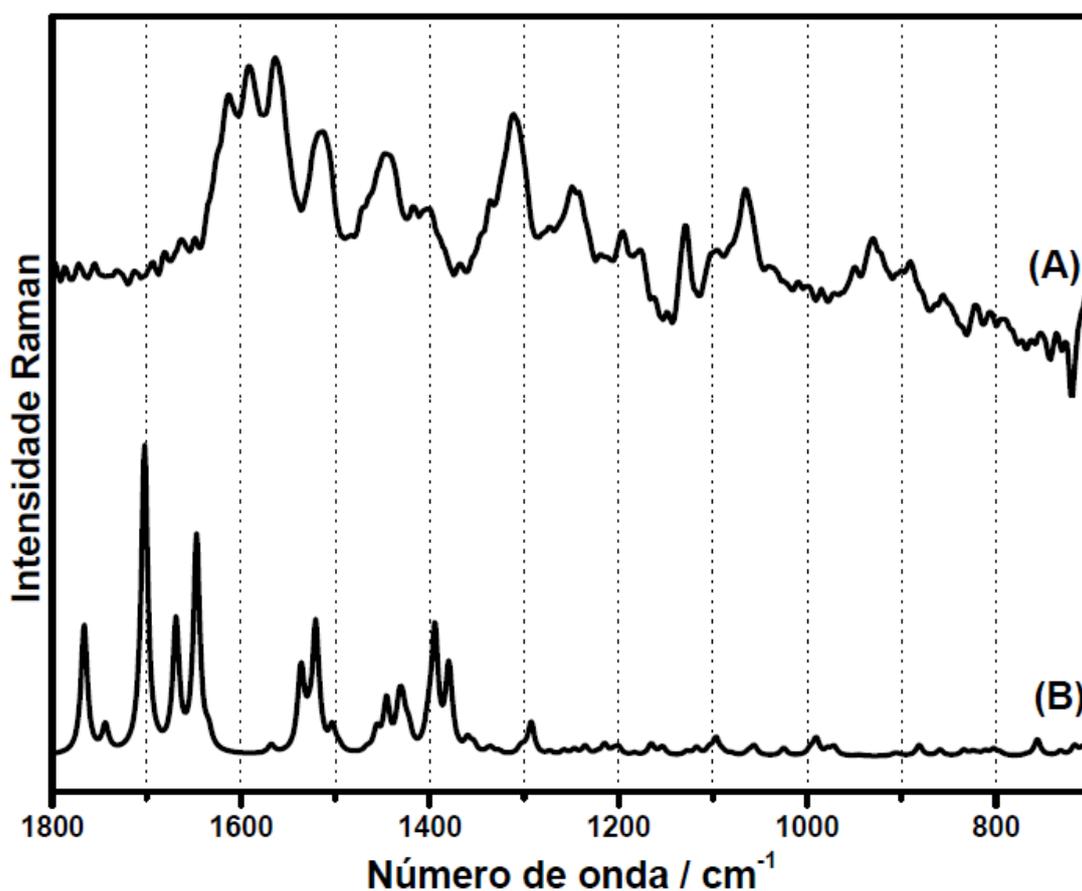


**Figura 49:** Geometria otimizada do complexo  $\text{Ag}_2\text{TCH}_2^\pm$

A Figura 50 mostra os espectros SERS da  $\text{TCH}_2^\pm$   $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  obtidos utilizando coloide de prata e  $\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$  e o espectro teórico do complexo  $\text{Ag}_2\text{TCH}_2^\pm$ .

A bandas Raman em  $1638_{\text{sh}}$  e  $1624 \text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico das carbonilas do anel A, respectivamente (Figura 48). Essas bandas têm baixa intensidade nos espectros SERS, apesar de apresentarem alta atividade Raman nos calculos DFT da  $\text{Ag}_2\text{TCH}_2^\pm$ , permitindo sugerir que tal movimento molecular não está envolvido na adsorção da  $\text{TCH}_2^\pm$ . As bandas SERS em  $1617$ ,  $1591$ ,  $1560$ ,  $1515$  e  $1445 \text{ cm}^{-1}$  são todas atribuídas a modos normais que envolvem o estiramento CO da carbonila do anel C e aparecem intensificadas devido à proximidade do  $\text{O}^{32}$  com a superfície da prata. As intensas bandas SERS em  $1311$  e  $1246 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas a modos normais que envolvem o estiramento CO das carbonilas dos anéis B e D, também são intensificadas pela proximidade de tais grupos com a superfície metálica da prata. As bandas SERS observadas em  $1194$ ,  $1174$ ,  $1124$  e  $1064 \text{ cm}^{-1}$  não podem ser definitivamente atribuídas pelos resultados DFT do complexo de superfície, que não têm modos Raman com

atividade significativa. Porém, vários dos modos observados em tal região espectral, envolvem contribuição dos estiramentos das carbonilas  $C^{24}O^{32}$ ,  $C^7O^{14}$  e  $C^4O^{12}$ , todas próximas à superfície da prata. A geometria de adsorção proposta permite inferir os mecanismos que levam à sinergia observada na ação antibacteriana. É sabido que a ação antibiótica da TC se dá pelos grupamentos amida e carboxila do anel A, que não participam da interação com a superfície de prata. Portanto, é possível que a ação antibacteriana da prata se some à da TC adsorvida. (Pereira-Maia *et al.*, 2010)



**Figura 50:** Espectro SERS da  $TCH_2^\pm$   $1,0 \cdot 10^{-3} mol.L^{-1}$  obtido utilizando coloide de prata (col 4A) e  $\lambda_0 = 1064 nm$  (A). Espectro Raman calculado do complexo  $Ag_2TCH_2^\pm$ . Espectro SERS com linha base ajustada para melhor visualização das bandas (B)

Na Tabela 22 são apresentados os números de onda das bandas mais intensas no espectro SERS da  $\text{TCH}_2^\pm$  e as bandas correspondentes do espectro teórico com a atribuição vibracional proposta.

**Tabela 22:** Atribuições vibracionais do espectro SERS da  $\text{TCH}_2^\pm$  obtidas a partir de cálculos teóricos da molécula interagindo com 2 átomos de prata. Os números de onda estão em  $\text{cm}^{-1}$ .

Experimental	Calculado	Atribuição vibracional
$\lambda_0 = 1064\text{nm}$		
1635sh	1766	$\nu(\text{C}^7\text{C}^8) + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32})$
-	1743	$\nu(\text{C}^5\text{O}^{13}, \text{C}^1\text{O}^{11})_s + \nu(\text{C}^{19}\text{O}^{20})$
-	1708	$\nu(\text{C}^5\text{O}^{13}, \text{C}^1\text{O}^{11}, \text{C}^{19}\text{O}^{20}) + \delta(\text{NH}_2) + \delta(\text{O}^{14}\text{H})$
1617	1702	$\nu(\text{CC})_D + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32})$
1591	1668	$\nu(\text{CC})_D + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32})$
1560	1647	$\nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32}) + \nu(\text{CC})_D$
1515	1537	$\nu(\text{CC})_D + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32}) + \delta(\text{C}^{26}\text{H}_3)$
1466sh	1446	$\nu(\text{CC})_C + \nu(\text{CC})_A + \nu(\text{C}^{15}\text{C}^{26})$
1445	1433	$\nu(\text{CC})_C + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32}) + \nu(\text{C}^{15}\text{C}^{26})$
1417	?	?
1402	?	?
1337	1394	$\nu(\text{CC})_{B,C,D} + \nu(\text{C}^{30}\text{O}^{31}) + \nu(\text{C}^{24}\text{O}^{32})$
1311	1380	$\nu(\text{CC})_{B,C,D} + \nu(\text{C}^{30}\text{O}^{31}) + \nu(\text{C}^{15}\text{C}^{26})$
1246	1293	$\nu(\text{CC})_{C,D} + \nu(\text{C}^7\text{O}^{14})$
1194	?	?
1174	?	?
1124	?	?
1064	?	?

$\nu$  - estiramento,  $\delta$  - deformação angular, s – simétrico, as – assimétrico, A,B,C,D – anéis rotulados na Figura 49.

## 5. CONCLUSÕES

As AgNPs mostraram um efeito antibacteriano intensificado quando houve a associação destas com alguns dos antibióticos testados. A associação das AgNPs, quitosana e os antibióticos levofloxacina, tetraciclina, rifampicina, benzilpenicilina, meropenem, ampicilina, amicacina, gentamicina, vancomicina e oxacilina mostraram uma decréscimo da CIM para  $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$  que é a concentração limite no protocolo CLSI utilizado para os testes biológicos.

Através da espectroscopia de absorção no UV-VIS foi possível monitorar as mudanças da banda LSPR do col 4A na presença da tetraciclina, levofloxacina e benzilpenicilina, onde se observou a estabilidade da suspensão das AgNPs na presença desses antibióticos em concentrações milimolar.

Baseado no  $\text{pK}_a$  da benzilpenicilina, considerou-se a espécie desprotonada como predominante na suspensão das AgNPs, e a atribuição dos espectros SERS utilizando cálculos DFT permitiu inferir que  $\text{BP}^-$  foi adsorvida sobre a superfície metálica da prata através das carbonilas do carboxilato e da amida linear. Também baseado nos valores de  $\text{pK}_a$  das diferentes espécies de levofloxacina, a espécie zwitteriônica, predominante no pH da suspensão das AgNPs, foi utilizada nos cálculos DFT. A atribuição do espectro SERS, permitiu inferir que os sítios de interação com a superfície da prata foi o carboxilato. Também baseados nos valores de  $\text{pK}_a$ , a tetraciclina zwitteriônica foi utilizada nos cálculos DFT. A atribuição vibracional do espectro SERS, permitiu inferir que as carbonilas dos anéis B e C estão mais próximas da superfície da prata. Baseados nos cálculos DFT e nas evidências experimentais, a atribuição do espectro SERS da rifampicina permitiu inferir que tal adsorbato adsorveu através dos anéis B,C por força de van der Waals. Isto leva a uma adsorção lábil, que só foi possível estudar quando a superfície metálica foi modificada com grupamentos hidroxila. Além disso, todas as geometrias de adsorção estão em acordo com a regra de seleção de superfície.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A elevada ação antibacteriana das AgNPs, observada *in vitro* quando associadas a quitosana e os antibióticos estudados até o momento, é motivadora para o estudo da ação desses sistemas *in vivo*. Pode-se ainda obter os espectros SERS dos antibióticos meropenem, oxacilina e ampicilina para se compreender a interação destes com a prata e inferir mecanismos de ação no meio biológico. Dentre estes, a ampicilina e a oxacilina são penicilinas, onde a atividade antibacteriana é dada principalmente pelo anel  $\beta$ -lactâmico, que observamos não interagir com o metal no sistema BP/AgNPs.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABID, J. P. et al. Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation. **Chemical Communications**, 2002. n. 7, p. 792-793.
- ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. **Journal of the American Chemical Society**, 1977/06/01 1977. v. 99, n. 15, p. 5215-5217.
- ALEKSEEV, V. G.; VOLKOVA, I. A. Acid-Base Properties of Some Penicillins. **Russian Journal of General Chemistry**, 2003. v. 73, n. 10, p. 1616-1618.
- ALT, V. et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. **Biomaterials**, 2004. v. 25, n. 18, p. 4383-4391.
- AROCA, R. **Surface enhanced vibrational spectroscopy**. Wiley. Canada: Wiley, 2006. p.
- BAGGIO, C. L.; SILVEIRA, A. F.; HYPOLITO, M. A. Estudo experimental anatômico-funcional da cocleotoxicidade da gentamicina com doses habituais para recém-nascidos. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica**, 2009. v. 21, p. 137-142.
- CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, estruturas e propriedades de a- e b-quitina. **Química Nova**, 2007. v. 30, p. 644-650.
- CAO, X. et al. Preparation of silver nanoparticles with antimicrobial activities and the researches of their biocompatibilities. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 2010. v. 21, n. 10, p. 2861-2868.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, June 1, 2001 2001. v. 65, n. 2, p. 232-260.
- COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of Escherichia coli by R-Factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, August 1, 1972 1972. v. 69, n. 8, p. 2110-2114.
- COLLERA-ZÚÑIGA, O.; GARCÍA JIMÉNEZ, F.; MELÉNDEZ GORDILLO, R. Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of Capsicum annum L. **Food Chemistry**, 2005. v. 90, n. 1-2, p. 109-114.
- CORIO, P. et al. Contribution of the Charge Transfer Mechanism to the Surface-Enhanced Raman Scattering of the Binuclear Ion Complex  $[\text{Fe}_2(\text{Bpe})(\text{CN})_{10}]^{6-}$  Adsorbed on a Silver Electrode in Different Solvents. **Langmuir**, 1999/03/01 1999. v. 15, n. 7, p. 2500-2507.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, May 21, 1999 1999. v. 284, n. 5418, p. 1318-1322.
- CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the

excitation wavelength. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, 1979. v. 75, p. 790-798.

ESPINOSA-CRISTÓBAL, L. F. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. **Materials Letters**, 2009. v. 63, n. 29, p. 2603-2606.

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

FERNÁNDEZ, E. J. et al. The preparation of highly active antimicrobial silver nanoparticles by an organometallic approach. **Nanotechnology**, 2008. v. 19, n. 18, p. 185602.

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

GALES, A. C. et al. Avaliação da atividade in vitro dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenems contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 1997. v. 43, p. 137-144.

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

GARDEA-TORRESDEY, J. L. et al. Alfalfa Sprouts: A Natural Source for the Synthesis of Silver Nanoparticles. **Langmuir**, 2003/02/01 2003. v. 19, n. 4, p. 1357-1361.

GRABAR, K. C. et al. Two-Dimensional Arrays of Colloidal Gold Particles: A Flexible Approach to Macroscopic Metal Surfaces. **Langmuir**, 1996/01/01 1996. v. 12, n. 10, p. 2353-2361.

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

HIRAMATSU, K. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **The Lancet**, 1997. v. 350, n. 9092, p. 1670-1673.

HIRANO, T. et al. Mechanism of the inhibitory effect of zwitterionic drugs (levofloxacin and grepafloxacin) on carnitine transporter (OCTN2) in Caco-2 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 2006. v. 1758, n. 11, p. 1743-1750.

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

HUANG, H.; YANG, X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. **Carbohydrate Research**, 2004. v. 339, n. 15, p. 2627-2631.

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

JEANMAIRE, D. L.; VAN DUYNE, R. P. Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 1977. v. 84, n. 1, p. 1-20.

KAHRAMAN, M. et al. Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2009/12/01 2009. v. 395, n. 8, p. 2559-2567.

KIM, I.-Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, 2008. v. 26, n. 1, p. 1-21.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 2007. v. 3, n. 1, p. 95-101.

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

KNEIPP, K. et al. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). **Physical Review Letters**, 1997. v. 78, n. 9, p. 1667-1670.

KUMAR, A. et al. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. **Nat Mater**, 2008. v. 7, n. 3, p. 236-241.

KVITEK, L. et al. Antibacterial activity and toxicity of silver – nanosilver versus ionic silver. **Journal of Physics: Conference Series**, 2011. v. 304, n. 1, p. 012029.

KVITEK, L. et al. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). **The Journal of Physical Chemistry C**, 2008/04/01 2008. v. 112, n. 15, p. 5825-5834.

KVITEK, L. et al. The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. **Journal of Materials Chemistry**, 2005. v. 15, n. 10, p. 1099-1105.

LACY, M. K. et al. Pharmacodynamic Comparisons of Levofloxacin, Ciprofloxacin, and Ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an In Vitro Model of Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, March 1, 1999 1999. v. 43, n. 3, p. 672-677.

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

LEES, A. W. et al. Toxicity from rifampicin plus isoniazid and rifampicin plus ethambutol therapy. **Tubercle**, 1971. v. 52, n. 3, p. 182-190.

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

LI, Q. et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, 2008. v. 42, n. 18, p. 4591-4602.

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

LI, W.-H.; LI, X.-Y.; YU, N.-T. Surface-enhanced resonance hyper-Raman scattering and surface-enhanced resonance Raman scattering of dyes adsorbed on silver electrode and silver colloid: a comparison study. **Chemical Physics Letters**, 1999. v. 312, n. 1, p. 28-36.

MANIE et al. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. **Letters in Applied Microbiology**, 1998. v. 26, n. 4, p. 253-258.

MBHELE, Z. H. et al. Fabrication and Characterization of Silver-Polyvinyl Alcohol Nanocomposites. **Chemistry of Materials**, 2003/12/01 2003. v. 15, n. 26, p. 5019-5024.  
MCCREERY, R. L. **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis**. Wiley. New York: 2000. 420 p.

MCDUGAL, L. K. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates from the United States: Establishing a National Database. **Journal of Clinical Microbiology**, November 1, 2003 2003. v. 41, n. 11, p. 5113-5120.

MENEZES, E. A. et al. Avaliação da atividade in vitro do meropenem contra cepas de Klebsiella pneumoniae produtoras de betalactamases de espectro expandido isoladas na cidade de Fortaleza, Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2007. v. 40, p. 349-350.

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

MORTON, S. M.; SILVERSTEIN, D. W.; JENSEN, L. Theoretical Studies of Plasmonics using Electronic Structure Methods. **Chemical Reviews**, 2011/06/08 2011. v. 111, n. 6, p. 3962-3994.

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

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

MOSKOVITS, M.; SUH, J. S. Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver. **The Journal of Physical Chemistry**, 1984/11/01 1984. v. 88, n. 23, p. 5526-5530.

NATAN, M. J. Concluding Remarks Surface enhanced Raman scattering. **Faraday Discussions**, 2006. v. 132, p. 321-328.

NEU, H. C. The Crisis in Antibiotic Resistance. **Science**, August 21, 1992 1992. v. 257, n. 5073, p. 1064-1073.

OLIVEIRA, J. A. A. D.; CANEDO, D. M.; ROSSATO, M. Otoproteção das células ciliadas auditivas contra a ototoxicidade da amicacina. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, 2002. v. 68, p. 7-13.

OYANEDEL-CRAVER, V. A.; SMITH, J. A. Sustainable Colloidal-Silver-Impregnated Ceramic Filter for Point-of-Use Water Treatment. **Environmental Science & Technology**, 2008/02/01 2007. v. 42, n. 3, p. 927-933.

PANÁČEK, A. et al. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2006/08/01 2006. v. 110, n. 33, p. 16248-16253.

PELCZAR; REID; CHAN. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. Makron Books. 1997. 517 p.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, 2010. v. 33, p. 700-706.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, 2009. v. 34, n. 7, p. 641-678.

POTARA, M. et al. Synergistic antibacterial activity of chitosan–silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. **Nanotechnology**, 2011. v. 22, n. 13, p. 135101.

QIAN, J. et al. Levofloxacin-containing Triple and Sequential Therapy or Standard Sequential Therapy as the First Line Treatment for *Helicobacter pylori* Eradication in China. **Helicobacter**, 2012. v. 17, n. 6, p. 478-485.

RAPINI, L. S. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2004. v. 56, p. 130-133.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, 2000. v. 46, n. 1, p. 1-27.

ROE, D. et al. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, April 1, 2008 2008. v. 61, n. 4, p. 869-876.

RU, E. L.; ETCHEGOIN, P. **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects**. Elsevier. New Zealand: Elsevier, 2008. 663 p.

RUBIM, J. C. et al. Contribution of Resonance Raman Scattering to the Surface-Enhanced Raman Effect on Electrode Surfaces. A Description Using the Time Dependent Formalism. **The Journal of Physical Chemistry**, 1995/10/01 1995. v. 99, n. 43, p. 15765-15774.

SAINI, R. K. et al. pH dependent reversible aggregation of Chitosan and glycol-Chitosan stabilized silver nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, 2011. v. 511, n. 4–6, p. 326-330.

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

SPRATT, B. G. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, August 1, 1975 1975. v. 72, n. 8, p. 2999-3003.

SUN, R. W.-Y. et al. Silver nanoparticles fabricated in HEPES buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. **Chemical Communications**, 2005. n. 40, p. 5059-5061.

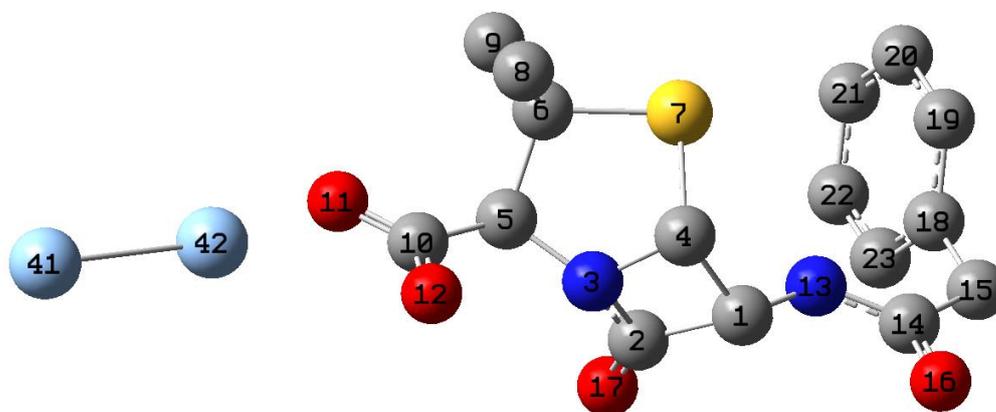
TIPPER, D. J.; STROMINGER, J. L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, October 1, 1965. v. 54, n. 4, p. 1133-1141.

VIGNESHWARAN, N. et al. A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. **Carbohydrate Research**, 2006. v. 341, n. 12, p. 2012-2018.

## ANEXOS

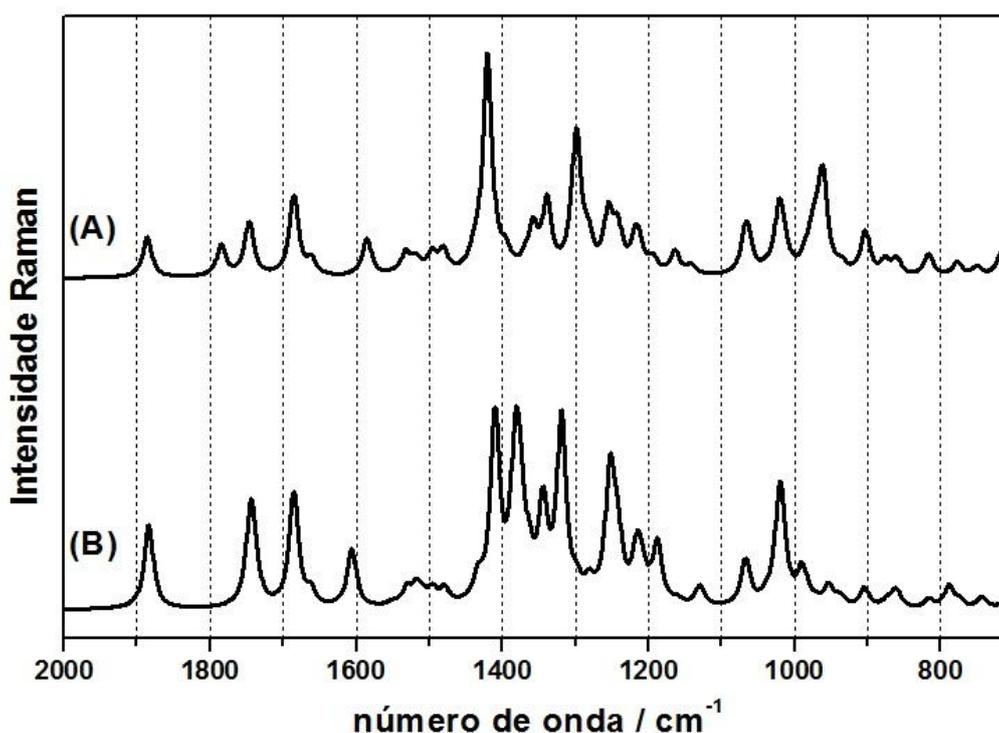
Benzilpenicilina

A geometria otimizada da BP<sup>-</sup> obtida interagindo com dois átomos de prata está apresentada na Figura 51. Este modelo de interação com a superfície de prata não foi utilizado pois o modelo com 4 átomos de prata convergiu para interações envolvendo outros grupamentos moleculares



**Figura 51:** Geometria otimizada da BP interagindo com dois átomos de prata. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza da estrutura

A Figura 52 mostra os espectros Raman calculados para os complexos  $\text{Ag}_2\text{BP}^-$  e  $\text{Ag}_4\text{BP}^-$ . O espectro Raman calculado do complexo  $\text{Ag}_2\text{BP}^-$  não foi utilizado como modelo para a atribuição do espectro SERS pelas várias diferenças observadas no padrão espectral dos dois modelos (ver Figura 52 e Tabela 23).



**Figura 52:** Espectro Raman calculado do complexo  $\text{Ag}_2\text{BP}^-$  (A). Espectro Raman calculado do complexo  $\text{Ag}_4\text{BP}^-$  (B)

No espectro Raman calculado da espécie  $\text{Ag}_2\text{BP}^-$ , a banda em  $1421\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento  $\text{C}^5\text{C}^{10}$  é intensificada devido à geometria de interação do carboxilato com os átomos de prata, mas a intensidade relativa de tal modo no espectro calculado da espécie  $\text{Ag}_4\text{BP}^-$  é menos intensa, e muito pouco intensa no espectro SERS, o que está de acordo com a regra de seleção de superfície. No espectro Raman calculado da BP na Figura 52, as bandas em  $1886$ ,  $1785$  e  $1746\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas aos movimentos das carbonilas da amida cíclica, da amida linear e do carboxilato, respectivamente (Tabela 23), não estão acopladas. Porém, no espectro Raman calculado da espécie  $\text{Ag}_4\text{BP}^-$  as bandas em  $1744$  e  $1738\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas às carbonilas do carboxilato e da amida linear, que são os sítios de interação com a superfície metálica e os valores de número de onda ficaram mais coerentes com os espectros SERS experimental. Além disso, a

banda SERS em  $1584\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento CN da amida linear (sítio de coordenação) está intensificada no espectro calculado para  $\text{Ag}_4\text{BP}^-$  e não possui intensidade significativa para  $\text{Ag}_2\text{BP}^-$ .

**Tabela 23:** Atribuição vibracional tentativa das bandas Raman e SERS das espécies da BP, na região de estiramento C=O e C=C, obtidos dos espectros experimentais e teóricos dos dois modelos de complexo de superfície. Os números de onda estão em  $\text{cm}^{-1}$ .

BPH		BP <sup>-</sup> sobre superfície de prata			Atribuição Tentativa
Raman	Teor.	SERS	Teor.		
			$\text{Ag}_2\text{BP}^-$	$\text{Ag}_4\text{BP}^-$	
1763 <sub>(sh)</sub>	1920	-	1886	1884	$\nu(\text{C}^2\text{O}^{17})$
1750	1880	-	-	-	$\nu(\text{C}^{10}\text{O}^{11})$
1661	1794	-	1785	-	$\nu(\text{C}^{14}\text{O}^{16})$
-	-	-	1746	-	$\nu(\text{C}^{10}\text{O}_2)_{\text{ass}}$
-	-	1684	-	1744	$\nu(\text{C}^{14}\text{O}^{16}) + \nu(\text{C}^{10}\text{O}_2)_{\text{ass}}$
-	-	1655	-	1738	$\nu(\text{C}^{10}\text{O}_2)_{\text{as}} \nu(\text{C}^{14}\text{O}^{16})$
1608	1684	1603	1686	1686	$\nu(\text{C}^{19}\text{C}^{20}) + \nu(\text{C}^{22}\text{C}^{23})$
1585	1568	1584	-	1606	$\nu(\text{C}^{14}\text{N}^{13})$
-	-	-	1661	-	$\nu(\text{C}^{18}\text{C}^{19}) + \nu(\text{C}^{21}\text{C}^{22})$
-	-	1440	1421	1410	$\nu(\text{C}^5\text{C}^{10}) + \delta(\text{CH}_3)_u$

$\nu$  - estiramento,  $\delta$  - deformação angular, ass – assimétrico;

### **Tetraciclina**

A Figura 55 mostra o espectro Raman calculado correspondentes as espécies  $TC^{2-}$ ,  $TCH^-$ ,  $TCH_2^\pm$  e  $TCH_3^+$  e a Figura 56 mostra os modelos otimizados para as espécies da TC, com quatro condições de protonação e dois complexos da espécie  $Ag_2TCH_2^\pm$ .

Na Figura 55 é evidenciado o efeito da desprotonação do  $O^{14}$  ( $pK_a=7.68$ ) sobre as intensidades relativas, principalmente nas regiões entre  $1200-1400\text{ cm}^{-1}$  e  $1600-1800\text{ cm}^{-1}$ . Para a primeira região, a espécie  $TCH^-$  apresenta uma forte banda em  $1304\text{ cm}^{-1}$  com contribuição  $\nu(CC)$  e  $\delta(CH)$  dos anéis B, C e D. Este mesmo modo aparece como uma banda pouco intensa para a espécie  $TC^{2-}$  e está ausente nas demais espécies, por perda de conjugação na protonação do  $O^{14}$ . A banda intensa em  $1264\text{ cm}^{-1}$ , observada para a espécie  $TC^{2-}$ , possui atribuição parecida.

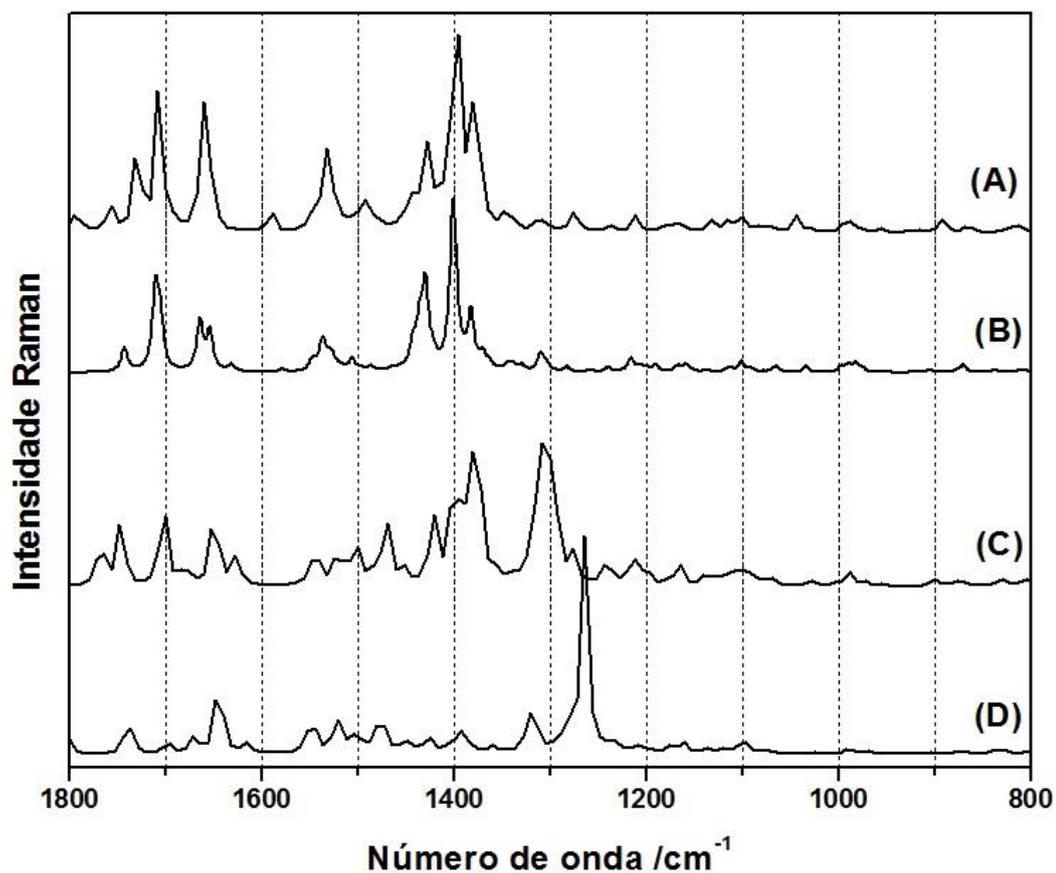
Seguindo a análise da região  $1200-1600\text{ cm}^{-1}$  na Figura 55, nota-se um decréscimo da intensidade na banda em torno de  $1400\text{ cm}^{-1}$  com os processos de desprotonação no  $O^{14}$  e  $N^{16}$ . Este modo normal possui em sua composição o estiramento simétrico dos oxigênios  $O^{14}$ ,  $O^{31}$  e  $O^{32}$ , cuja simetria é significativamente modificada pela desprotonação.

Na região entre  $1600 - 1800\text{ cm}^{-1}$  (Figura 55) bandas atribuídas as carbonilas e ao estiramento CC são mais intensas para as espécies  $TCH_2^\pm$  e  $TCH_3^+$ . Para essas espécies, as bandas em  $1654$  e  $1664\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas principalmente aos estiramentos CC do anel D e da carbonila  $C^{24}O^{32}$ . Para as bandas em  $1710$  e  $1741\text{ cm}^{-1}$ , os estiramentos da três carbonilas do anel A  $\nu(C^5O^{13}, C^1O^{11}, C^{19}O^{20})$  tem contribuição principal para o modo normal junto com as deformações angulares do  $NH_2$  e  $O^{14}H$  (ver Tabela 21 do texto principal). A perda de intensidade relativa destas bandas com a desprotonação do  $O^{14}$  mostra que este sítio interfere significativamente em toda a estrutura.

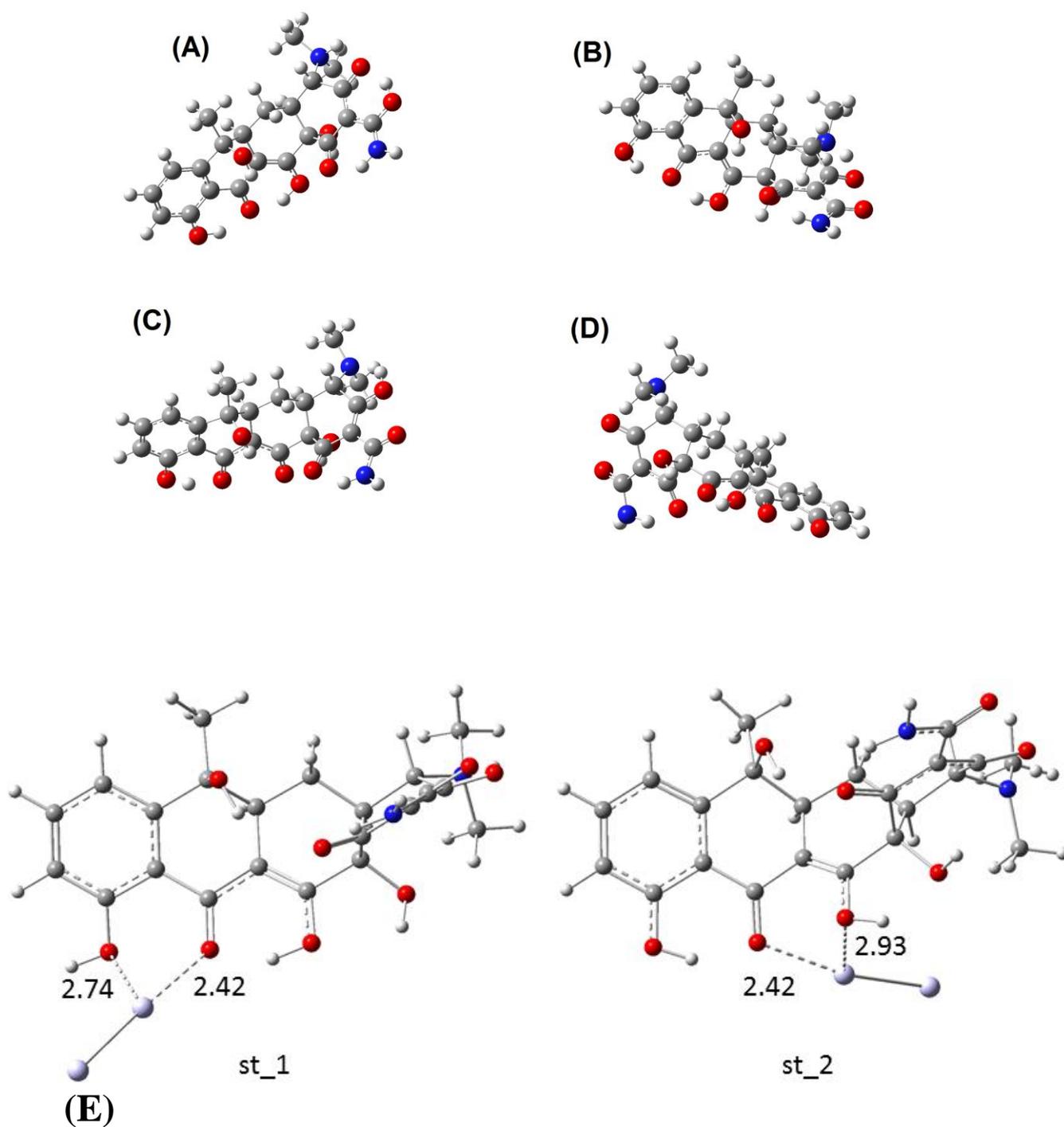
De forma a auxiliar na atribuição do espectro SERS, foram propostos dois modelos para os complexos de superfície  $Ag_2TCH_2^\pm$ , nos quais o dímero de prata está ligado nos  $O^{31}-O^{32}$  (st\_1) ou nos  $O^{32}-O^{14}$  (st\_2). Os espectros Raman calculados de tais complexos de superfície são mostrados na Figura 57. A diferença da energia livre (fase gasosa) é  $1,4\text{ kcal.mol}^{-1}$  favorecendo o modelo st\_2. Para esta espécie, as regiões observadas no espectro teórico, entre  $1350-1470\text{ cm}^{-1}$ , e  $1650-1850\text{ cm}^{-1}$  mostram perfis mais próximos aos do espectro SERS.

Desta forma, a banda SERS em  $1515\text{ cm}^{-1}$ , que foi atribuída ao estiramento CC do anel D e estiramento  $C^{24}O^{32}$ , e correlacionada com a banda em  $1537\text{ cm}^{-1}$  no espectro da estrutura st\_2.

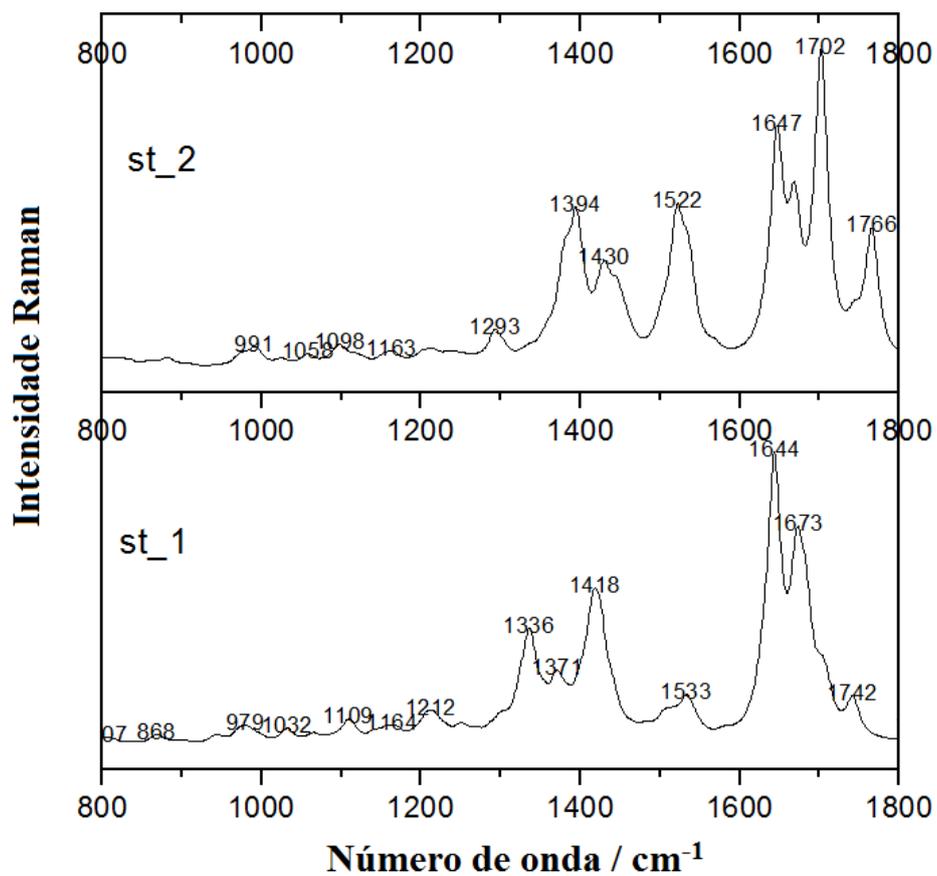
Para o espectro da espécie  $\text{TCH}_2^\pm$ , o modo mais próximo é correlacionado com a banda em  $1535\text{ cm}^{-1}$ , atribuída aos estiramentos de todas as carbonilas dos anéis B,C,D, que perdem o acoplamento quando a molécula interage com um dímero de prata



**Figura 53:** Espectros Raman calculados  $\text{TCH}_3^+$ (A),  $\text{TCH}_2^\pm$  (B),  $\text{TCH}^-$  (C) e  $\text{TC}^{2-}$ (D)



**Figura 54:** Modelos otimizados das várias espécies de TC.  $TCH_3^+$ (A),  $TCH_2^+$ (B),  $TCH^-$ (C),  $TC^{2-}$ (D) e dois complexos  $Ag_2TCH_2^{\pm}$ (E)



**Figura 55:** Espectros calculados para os modelos dos complexos de superfície Ag<sub>2</sub>TCH<sub>2</sub><sup>±</sup>