

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

Dhieniffer Ferreira de Carvalho

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS COM SUPERFÍCIES  
METÁLICAS POR ESPECTROSCOPIA SERS**

Juiz de Fora  
2012

Dhieniffer Ferreira de Carvalho

**Estudo da interação de biomoléculas  
com superfícies metálicas por  
espectroscopia SERS**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana

Juiz de Fora

2012

**Dedico este trabalho...**

*À Deus,  
que permitiu que tudo pudesse ser realizado.*

*Aos meus pais, Sylvania e Antonio,  
pelo apoio incondicional em todos os momentos, pela compreensão e incentivo ao  
longo da minha trajetória.*

*Ao meu irmão, Vítor,  
pela paciência e apoio.*

*Ao Vinicius,  
Pelo amor e compreensão em todo este período.*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Sant’Ana pela orientação, paciência, apoio e interesse pela minha formação acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Gustavo F. S. Andrade pela participação e colaboração efetiva na conclusão deste trabalho.

Aos amigos de laboratório pela ajuda e discussões, mas principalmente pelos momentos de alegria e sincera amizade. Em especial, Aline, Tatiana e Isabela.

Aos meus amigos de todos os momentos Vanessa End, Ana Paula e Paola Coutinho.

Aos professores da Universidade de São Paulo, que de maneira tão calorosa me receberam, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia L. A. Temperini, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paola Corio, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dalva Lúcia A. de Faria, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria C. Ribeiro.

Aos amigos da Universidade de São Paulo, que muito me ajudaram durante os dois meses de estadia, em especial Luís Cerdeira e Pollyana Castro.

Aos colegas do Instituto de Metrologia, que muito contribuíram para obtenção das imagens de microscopia eletrônica apresentadas neste trabalho.

Aos colegas do Centro de Tecnologia Mineral que disponibilizaram o uso do equipamento Raman para a realização de algumas medidas e testes.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira, mesmo que simplória, fizeram parte desta vitória.

## **Resumo**

Nesta dissertação foi utilizada a espectroscopia Raman intensificado por superfície (*Surface Enhanced Raman Scattering* – SERS) para monitorar a adsorção de moléculas de interesse biológico em superfície metálica de ouro ou cobre.

Foram sintetizadas diferentes nanopartículas metálicas de ouro, variando-se a concentração, a ordem de adição dos reagentes e a temperatura em que as sínteses foram feitas. Através dos espectros de extinção dos coloides metálicos foi possível estimar a distribuição de tamanhos obtida em cada uma das sínteses, e as amostras foram também analisadas por medidas de microscopia eletrônica de varredura e espalhamento dinâmico de luz.

As nanopartículas de cobre foram obtidas em meio aquoso, sofrendo oxidação da superfície com formação de óxido de cobre (II), cuja cinética foi acompanhada por espectros de extinção. Quando um adsorbato com caráter redutor foi adicionado à superfície metálica, houve redução do óxido de cobre, presente na superfície da nanopartícula, permitindo a obtenção do espectro SERS da forma oxidada da espécie adsorvida. A molécula que possibilitou o estudo deste mecanismo redox foi a p-fenilenodiamina, sendo obtido o espectro SERS da espécie oxidada radical cátion.

Serotonina, adrenalina, L-carnosina, melatonina, rifampicina e albumina sérica bovina foram os adsorbatos utilizados para a obtenção dos espectros SERS em coloide de ouro. Estas moléculas apresentam anéis aromáticos, que contribuem para uma elevada polarizabilidade molecular e por isso se espera elevado sinal SERS. Estas espécies também possuem átomos de nitrogênio e oxigênio, os quais estão disponíveis como sítios de coordenação para a interação com a superfície metálica. Para obtenção dos espectros SERS foram utilizadas diferentes radiações excitantes, na busca da ressonância com as transições do plasmon de superfície localizado das nanopartículas de ouro.

Foi ainda realizado o cálculo teórico vibracional para cada um dos adsorbatos estudados, isolados ou coordenados a um ou mais átomos de ouro ou cobre, através dos quais foi realizada a atribuição dos espectros Raman e SERS dos sólidos e dos complexos de superfície formados, respectivamente. Através desta atribuição e das

regras de seleção de superfície foi possível determinar a geometria de adsorção da biomolécula à superfície da nanopartícula metálica.

**Palavras-chave:** SERS, LSPR, nanoestruturas metálicas, biomoléculas.

## **Abstract**

In this dissertation the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) spectroscopy was used to monitor molecules with biological interest adsorbed on gold or copper metallic surfaces.

Different gold metallic nanoparticles were synthesized varying the concentration, the addition order of the reagents and the temperature in which the syntheses were made. The size distributions were estimated for each colloid synthesis by the extinction spectra of the suspensions, and the samples were also analyzed by scanning electronic microscopy and dynamic light scattering techniques.

Copper nanoparticles were obtained in aqueous media, undergoing surface oxidation with the formation of Cu(II) oxide, whose kinetic was followed by extinction spectra. When a reducer adsorbate was added to the nanoparticle suspension, the copper oxide, present in the metallic surfaces, undergoing reduction, allowing the achievement of SERS spectrum of the adsorbate in the oxidized form. The molecule which allowed the study of this redox mechanism was p-phenylenediamine, and the SERS spectrum was obtained from the radical cation species.

Serotonin, adrenaline, L-carnosine, melatonin, rifampicin and bovine serum albumin were the adsorbates selected to obtain the SERS spectra in gold colloids. These molecules exhibit aromatic rings, whose is expected high contribution for the molecular polarizability, and in consequence of this a great SERS signal. Such species also have nitrogen and oxygen atoms, which are available coordination sites for interaction with the metallic surface. Different exciting radiations were used for searching of the resonance with the localized surface plasmon transitions of the gold nanoparticles.

It was made the vibrational theoretical calculations for each studied adsorbate, isolated and coordinated to one or more gold or copper atoms, that were used for the assignment of Raman and SERS spectra of the solid and the surface complex, respectively. Through such assignment and the surface selection rules it was possible to determinate the adsorption geometry of biomolecule on the metallic surface.

**Keywords:** SERS, LSPR, metallic nanostructure, biomolecules

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

$\delta$ : deformação angular no plano;

$\eta$ : sombrinha (*umbrella*);

v: estiramento;

$\rho$ : pêndulo (*rocking*);

$\sigma$ : tesoura (*scissoring*);

$\tau$ : torção (*twist*);

$\gamma$ : deformação angular fora do plano;

$\omega$ : abano (*wagging*);

an: anel;

assim: assimétrico;

BSA: Albumina Sérica Bovina;

CETEM: Centro de Tecnologia Mineral;

DFT: teoria de funcional densidade;

DLS: espalhamento dinâmico de luz;

HOMO: orbital molecular ocupado de maior energia;

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia;

LEM: Laboratório de Espectroscopia Molecular;

LSPR: ressonância de plasmon de superfície localizado;

LUMO: orbital molecular desocupado de menor energia;

MEV: microscopia eletrônica de varredura;

NP: nanopartícula;

resp.: movimento vibracional de respiração do anel aromático;

RR: Raman ressonante;

SERRS: espectroscopia Raman ressonante intensificada por superfície;

SERS: espectroscopia Raman intensificada por superfície;

sh: ombro (*shoulder*);

sim: simétrico.



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Concentração final dos reagentes em mol.L <sup>-1</sup> e proporção molar entre parênteses.....	28
<b>Tabela 2:</b> Valores de número de onda ( cm <sup>-1</sup> ) para as bandas do espectro Raman da serotonina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional.....	51
<b>Tabela 3:</b> Valores de número de onda ( cm <sup>-1</sup> ) para as bandas do espectro SERS da serotonina adsorvida em ouro e respectiva atribuição vibracional.....	56
<b>Tabela 4:</b> Valores de número de onda ( cm <sup>-1</sup> ) para as bandas do espectro Raman da adrenalina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional.....	62
<b>Tabela 5:</b> Valores de número de onda ( cm <sup>-1</sup> ) das bandas do espectro SERS da adrenalina em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da adrenalina adsorvida em superfície de ouro, e respectiva atribuição vibracional. ....	65
<b>Tabela 6:</b> Valores de número de onda ( cm <sup>-1</sup> ) das bandas do espectro SERS da adrenalina oxidada em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da adrenalina oxidada adsorvida em superfície de ouro, e respectiva atribuição vibracional. ....	68
<b>Tabela 7:</b> Valores de número de onda ( cm <sup>-1</sup> ) para as bandas do espectro Raman da p-fenilenediamina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional. ....	72
<b>Tabela 8:</b> Valores de número de onda ( cm <sup>-1</sup> ) das bandas do espectro SERS da p-fenilenediamina adsorvida em coloide de cobre em comparação com o espectro Raman teórico da p-fenilenediamina adsorvida em superfície de cobre, e respectiva atribuição vibracional. ....	75
<b>Tabela 9:</b> Valores de número de onda ( cm <sup>-1</sup> ) para as bandas do espectro Raman da L-carnosina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional. ....	80
<b>Tabela 10:</b> Valores de número de onda ( cm <sup>-1</sup> ) das bandas do espectro SERS da L-carnosina em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da L-carnosina interagindo com dois átomos de ouro, e respectiva atribuição vibracional. ..	83

**Tabela 11:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para as bandas dos espectros Raman da melatonina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional..... 87

**Tabela 12:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas do espectro SERS da melatonina em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da melatonina adsorvida em superfície de ouro, e respectiva atribuição vibracional. .... 90

**Tabela 13:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas dos espectros Raman rifampicina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional..... 95

**Tabela 14:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas do espectro SERS da rifampicina em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da rifampicina adsorvida em superfície de ouro, e sua respectiva atribuição vibracional. . 99

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Estruturas químicas de alguns adsorbatos utilizados neste trabalho. ....	3
<b>Figura 2:</b> Fluxograma apresentando as mais significantes contribuições para o efeito SERS (Aroca, 2006) (adaptado). ....	15
<b>Figura 3:</b> Diagrama de energia ilustrando a energia da banda da nanoestrutura metálica, e a diferença entre os níveis HOMO e LUMO da molécula adsorvida (Aroca, 2006) (adaptado). ....	18
<b>Figura 4:</b> Valor previsto para o fator de qualidade de diferentes metais ao longo da faixa de comprimentos de onda de 200 a 1200 nm (Etchegoin, 2009). ....	20
<b>Figura 5:</b> Evolução da densidade e diferença de energia entre níveis conforme o número de átomos do sistema aumenta (Morton, Silverstein e Jensen, 2011) (adaptado). ....	21
<b>Figura 6:</b> Espectros de extinção das NPs nucleadoras de prata e do coloide sintetizado segundo M3. ....	32
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática dos dois mecanismos de crescimento de NPs, adaptado (Penn et al., 2001). ....	33
<b>Figura 8:</b> Espectros de extinção do coloide M1 armazenado sob refrigeração. ....	34
<b>Figura 9:</b> Distribuição de tamanhos do coloide M1 sem exposição ao ultrassom (A); e após 30 minutos no ultrassom (B). ....	36
<b>Figura 10:</b> Imagens MEV das AuNPs sintetizadas segundo M1 com diferentes magnificações. ....	37
<b>Figura 11:</b> Espectros de extinção do coloide M1 e M2. ....	38
<b>Figura 12:</b> Espectros de extinção dos coloides obtidos nos procedimentos M3, M4 e M5. ....	39
<b>Figura 13:</b> Distribuição de tamanhos do coloide M3. ....	40
<b>Figura 14:</b> Imagens de MEV do coloide M3 com diferentes magnificações. ....	41

<b>Figura 15:</b> Espectro de extinção do coloide M6.....	42
<b>Figura 16:</b> Imagens MEV para o coloide M6.....	43
<b>Figura 17:</b> Espectros de extinção do coloide de cobre no início e no final da síntese (A); espectros de extinção do coloide ao longo da síntese (B).....	44
<b>Figura 18:</b> Formação das NPs de Cu@CuO (Rice <i>et al.</i> , 2011).....	45
<b>Figura 19:</b> Imagem de microscopia eletrônica de varredura das CuNPs sintetizadas...	46
<b>Figura 20:</b> espectro eletrônico da solução aquosa de serotonina ( $1.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ).....	47
<b>Figura 21:</b> Espectros de extinção do coloide M1 com adição de serotonina ( $1.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> e ácido mercaptopropanóico ( $1.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ). .....	48
<b>Figura 22:</b> Espectro Raman da serotonina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A) e 632,8 nm (B); espectro teórico da serotonina (C). .....	49
<b>Figura 23:</b> Estrutura otimizada para a serotonina.....	50
<b>Figura 24:</b> Espectros SERS da serotonina ( $2.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ), na presença de ácido mercaptopropanóico ( $1.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ), medidos ao longo do tempo. ....	52
<b>Figura 25:</b> Espectro SERS da serotonina ( $2.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ), na presença de ácido mercaptopropanóico ( $1.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ) com radiação excitante em 1064 nm (A); espectro teórico da serotonina adsorvida em átomo de ouro (B).....	54
<b>Figura 26:</b> Estrutura otimizada para a serotonina interagindo com um átomo de ouro.	55
<b>Figura 27:</b> Reação de oxidação da adrenalina. ....	57
<b>Figura 28:</b> Espectro eletrônico de solução aquosa de adrenalina ( $1.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> ) neutra e oxidada, com caminho óptico de 0,5 cm. ....	58
<b>Figura 29:</b> Espectro de extinção do coloide M3 na presença de solução aquosa de adrenalina ( $1.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> ) e de 2-mercaptoetanol ( $1.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> ), com caminho óptico de 0,5 cm. ....	59
<b>Figura 30:</b> Espectro Raman da adrenalina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A), 632,8 nm (B) e espectro teórico da adrenalina (C). ....	60

<b>Figura 31:</b> Estrutura otimizada para a adrenalina.....	61
<b>Figura 32:</b> Espectro SERS da adrenalina ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em coloide de ouro na presença de propanotiol, com radiação excitante em 514,5 nm (A); espectro teórico do complexo de superfície formado entre a adrenalina e o ouro (B). .....	63
<b>Figura 33:</b> Estrutura otimizada para a adrenalina adsorvida em superfície de ouro. ....	64
<b>Figura 34:</b> Espectros SERS da adrenalina oxidada ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em coloide de ouro, com radiação excitante em 1064 nm (A); espectro teórico do complexo de superfície formado entre adrenalina oxidada e ouro. ....	66
<b>Figura 35:</b> Estrutura otimizada da adrenalina oxidada adsorvida em superfície de ouro. ....	67
<b>Figura 36:</b> Espectro eletrônico da p-fenilenodiamina ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em solução aquosa e do radical cátion ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em solução aquosa.....	69
<b>Figura 37:</b> Espectro de extinção do coloide de cobre na ausência/presença de p-fenilenodiamina ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ). .....	70
<b>Figura 38:</b> Espectro Raman da p-fenilenodiamina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A) e espectro teórico da p-fenilenodiamina (B).....	71
<b>Figura 39:</b> Estrutura otimizada para a p-fenilenodiamina.....	72
<b>Figura 40:</b> Espectro SERS da p-fenilenodiamina radical cátion ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) adsorvida em coloide de cobre, com radiação excitante em 1064 nm (A); espectro Raman teórico do complexo de superfície formado entre a p-fenilenodiamina e a superfície de cobre (B). .....	73
<b>Figura 41:</b> Estrutura otimizada para a p-fenilenodiamina adsorvida em superfície de cobre. ....	74
<b>Figura 42:</b> Espectros de extinção do coloide M3 na presença e ausência de solução aquosa $1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de L-carnosina, e espectro eletrônico de solução aquosa de L-carnosina ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ). .....	77
<b>Figura 43:</b> Espectro Raman da L-carnosina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A), 632,8 nm (B) e espectro teórico da L-carnosina (C).....	78

<b>Figura 44:</b> Estrutura otimizada para a L-carnosina. ....	79
<b>Figura 45:</b> Espectro SERS da L-carnosina ( $2.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ) em coloide de ouro (M3) com radiação excitante em 632,8 nm (A); espectro teórico do complexo de superfície formado entre a L-carnosina e o ouro (B). ....	81
<b>Figura 46:</b> Estrutura otimizada para o complexo de superfície formado entre a L-carnosina e a superfície de ouro, apresentadas em duas perspectivas diferentes. ....	82
<b>Figura 47:</b> Espectro eletrônico da solução aquosa de melatonina ( $1.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> ), espectro de extinção do coloide de ouro (M3) na ausência e presença de melatonina ( $1.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ) e propanotiol ( $2.10^{-5}$ mol.L <sup>-1</sup> ). ....	84
<b>Figura 48:</b> Espectro Raman da melatonina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A), 632,8 nm (B) e espectro teórico da melatonina(C). ....	85
<b>Figura 49:</b> Estrutura otimizada para a Melatonina. ....	86
<b>Figura 50:</b> Espectro SERS da melatonina ( $1.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ) em coloide de ouro (M3), na presença de propanotiol ( $2.10^{-5}$ mol.L <sup>-1</sup> ) com radiação excitante em 632,8 nm (A); espectro teórico do complexo de superfície formado entre a melatonina e o ouro (B)..	88
<b>Figura 51:</b> Estrutura otimizada para a melatonina adsorvida em superfície de ouro. ...	89
<b>Figura 52:</b> Espectros LSPR do coloide de ouro (M1) na presença de diferentes concentrações de solução aquosa de rifampicina, e espectro eletrônico da solução aquosa de rifampicina, com caminho óptico de um cm. ....	92
<b>Figura 53:</b> Espectro Raman da rifampicina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A), 638,0 nm (B) e espectro teórico da rifampicina (C). ....	93
<b>Figura 54:</b> Estrutura otimizada para a rifampicina. Os átomos de hidrogênio foram omitidos por uma questão de clareza (acima). Fórmula estrutural da rifampicina (abaixo). ....	94
<b>Figura 55:</b> Espectro SERS da rifampicina ( $1.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> ) em coloide de ouro (M1) com radiação excitante em 1064 nm (A). Espectro SERS da rifampicina ( $1.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> ) em coloide de ouro (M3) na presença de 2-mercaptoetanol ( $2.10^{-6}$ mol.L <sup>-1</sup> ), com	

radiação excitante em 638 nm (com ajuste da linha base) (B). Espectro teórico do complexo formado entre a rifampicina e seis átomos de ouro (C)..... 97

**Figura 56:** Estrutura otimizada para a rifampicina adsorvida em superfície de ouro apresentadas em duas perspectivas diferentes. Os átomos de hidrogênio foram omitidos por uma questão de clareza..... 98

**Figura 57:** Espectro de eletrônico de solução aquosa de BSA ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ); espectro de extinção do coloide M3 na ausência e na presença de solução aquosa 2-mercaptoetanol ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) e de BSA ( $7,5.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ )..... 101

**Figura 58:** Espectro SERS da BSA ( $1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em coloide de ouro M3, na presença de propanotiol ( $2.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) com radiação excitante em 632,8 nm (A); espectro Raman da BSA sólida com radiação excitante em 1064 nm..... 102

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 ADSORBATOS ESTUDADOS.....	3
1.2 A ESPECTROSCOPIA RAMAN E O EFEITO SERS .....	11
1.2.1 O Efeito eletromagnético.....	15
1.2.2 O efeito químico .....	17
1.3 O EFEITO DE RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE LOCALIZADO .....	19
1.4 MODELAGEM QUÂNTICA .....	21
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3 - PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	24
3.1 EQUIPAMENTOS .....	24
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.2.1 Síntese das nanopartículas de prata (AgNPs).....	25
3.2.2 Síntese das nanopartículas de prata com núcleo de sílica (SiO <sub>2</sub> @Ag).....	25
3.2.3 Síntese das nanopartículas de ouro .....	26
3.2.4 Síntese das nanopartículas de cobre .....	28
3.3 CÁLCULOS TEÓRICOS .....	29
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	31
4.1.1 Nanopartículas de ouro.....	31
4.1.2 Nanopartículas de cobre .....	43
4.2 ESTUDO DOS ADSORBATOS.....	46
4.2.1 Serotonina.....	46
4.2.2 Adrenalina .....	57
4.2.3 para-Fenilenodiamina .....	69
4.2.4 L-carnosina .....	76



4.2.5 Melatonina.....	84
4.2.6 Rifampicina .....	91
<b>5- CONCLUSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>6- REFERÊNCIAS .....</b>	<b>108</b>

## **1 – INTRODUÇÃO**

A nanociência é umas das principais áreas do conhecimento científico atual e que certamente resultará em avanço fundamental para as mais diversas atividades, tais como: medicina, química, forense, ambiental e etc. Como exemplo, podem ser citadas as aplicações biomédicas de nanopartículas (NPs) metálicas iniciadas em 1970, quando Faulk e colaboradores (Page Faulk e Malcolm Taylor, 1971) passaram a mudar sínteses de NPs de metais nobres, estudadas desde o século XIX por Faraday (Faraday, 1857), e aprimoradas por Turkevich (Turkevich, Stevenson e Hillier, 1951). Neste contexto, as nanoestruturas apresentam um forte apelo na Ciência, principalmente em aplicações biológicas (Whitesides, 2003) - devido à elevada sensibilidade de reconhecimento molecular.

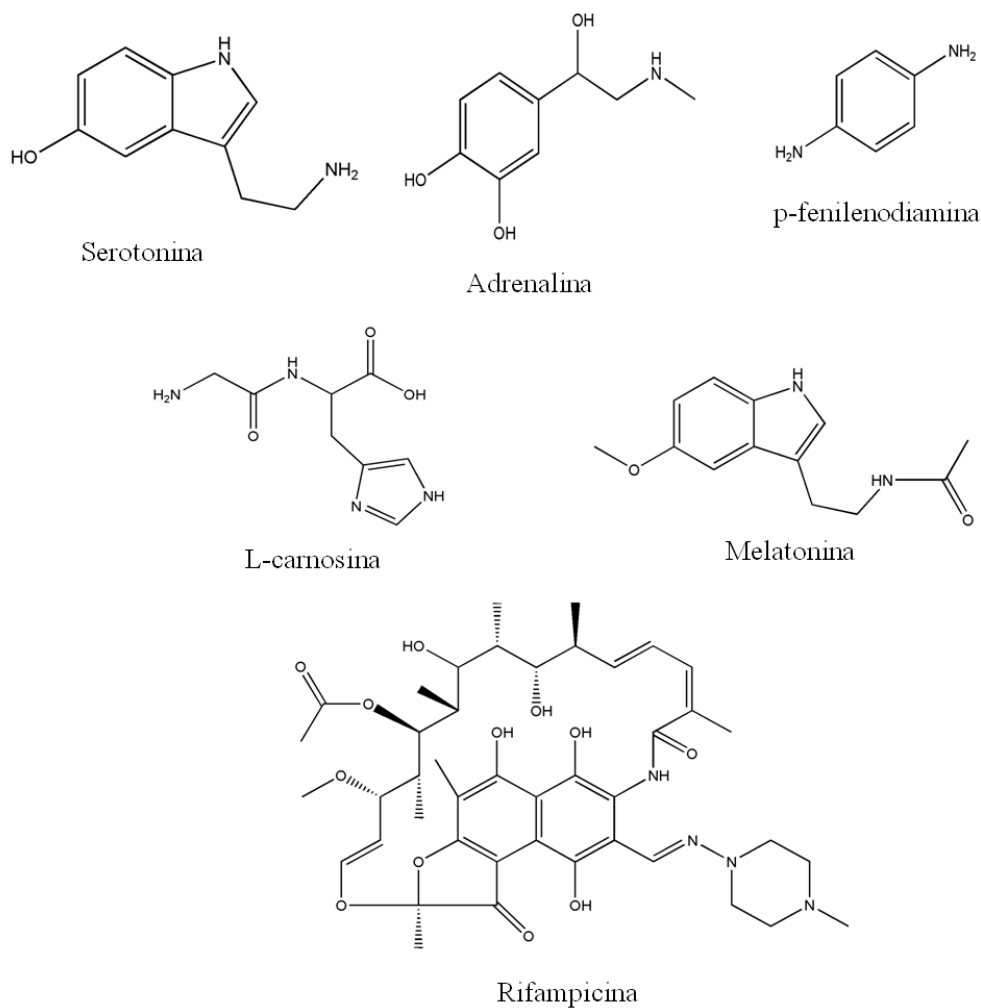
Sistemas contendo nanopartículas de metais nobres tem sido propostos como metodologias mais eficientes, rápidas e sensíveis para a substituição de ensaios utilizado na detecção de biomoléculas (Larguinho e Baptista, 2012). Estas NPs, normalmente constituídas por clusters de átomos metálicos, apresentam propriedades características, tais como comportamento espectroscópico variável, além de maior área superficial. Além disso, há a oscilação coletiva dos elétrons livres na interface metal-dielétrico, quando a frequência da luz incidente coincide com a frequência de oscilação dos elétrons (Larguinho e Baptista, 2012), originando a ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR – *Localized Surface Plasmon Resonance*). Estas oscilações são influenciadas pela forma, tamanho, dispersão e composição das NPs, gerando a coloração intensa, além do grande espalhamento de luz observado em dispersões coloidais de NPs.

Experimentalmente, observa-se que as NPs interagem fortemente com os organismos vivos (Whitesides, 2003). A superfície da NP é inicialmente exposta ao fluido biológico, contendo enorme quantidade de proteínas, e muitas outras biomoléculas complexas, que se ligam competitivamente à superfície da NP. Esta superfície é imediatamente modificada pela adsorção de biomoléculas, tais como proteínas e lipídios, presentes no fluido biológico (Mahon *et al.*, 2012). É importante salientar o fato de que a adsorção da biomolécula altera tanto o comportamento biológico e a identidade da NP quanto a biomolécula (Nyström e Fadeel, 2012). As

interações eletrostáticas específicas são as principais forças de atração ou repulsão entre biomoléculas (Nel *et al.*, 2009), e a formação de uma camada biomolecular na superfície da NP induz o surgimento das interações do tipo van der Waals, as quais podem afetar a estrutura e as propriedades da biomolécula (Shemetov, Nabiev e Sukhanova, 2012). A questão da estrutura se torna particularmente importante quando consideradas as características funcionais destas moléculas. A interação das biomoléculas com a superfície das NPs pode influenciar consideravelmente a atividade biológica do composto inicial, ou até mesmo extinguir a atividade destas. Desta forma, o uso de ferramentas que possam investigar a interação do sistema formado entre as NPs e as biomoléculas é de fundamental importância.

Dispositivos biosensíveis tem sido elaborados de modo a se ligarem especificamente a biomoléculas, de forma que o novo sistema seja hábil em converter este evento local (ponto de interação) em um sinal mensurável. O mecanismo de detecção biomolecular é frequentemente baseado em medidas de absorção óptica (Combs *et al.*, 2011), contudo estes métodos tradicionais não proporcionam uma detecção fácil e direta dos analitos biomoleculares. Para tal a espectroscopia de espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS – *Surface Enhanced Raman Scattering*) tem-se mostrado uma técnica útil e de alta sensibilidade, permitindo a detecção molecular inclusive de uma única molécula (Kneipp *et al.*, 1997; Nie e Emory, 1997; Artur *et al.*, 2012; Potara *et al.*, 2012).

Diante da importância e vantagens apresentadas pelas espectroscopias SERS e LSPR como ferramentas emergentes na detecção de analitos de interesse biológico, este trabalho apresenta o uso de NPs de ouro e cobre na detecção de biomoléculas. Os adsorbatos estudados neste projeto foram a serotonina, a adrenalina, a melatonina, a L-carnosina, a Albumina Sérica Bovina (BSA), a p-fenilenodiamina e a rifampicina, cujas estruturas estão apresentadas na figura 1.



**Figura 1:** Estruturas químicas de alguns adsorbatos utilizados neste trabalho.

### 1.1 Adsorbatos estudados

#### *Serotonina*

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é um neurotransmissor produzido principalmente no tronco encefálico (sistema nervoso central), e amplamente distribuído no cérebro (Mössner e Lesch, 1998). É responsável por várias funções fisiológicas, tais como ritmos cardíaco e endócrino, atividade reprodutiva, sono, humor, ansiedade, função motora (Mössner e Lesch, 1998). Fora do sistema nervoso central, a serotonina está presente nas plaquetas, linfócitos, monócitos, macrófagos, mastócitos dentre outros tipos de células (Mössner e Lesch, 1998).

O papel da serotonina como um neurotransmissor do sistema nervoso central está bem estabelecido, existem diversas funções que continuam a serem estudadas

atualmente, como por exemplo, sua atuação como modulador do sistema imunológico. Em áreas machucadas ou inflamadas, tem sido mostrado que a serotonina regula a resposta imunológica, como agregação das plaquetas, funções acessórias dos macrófagos, e ativação e proliferação das células T (Tu, Eisen e Chang, 2010). Além disso, a serotonina influencia na resposta do organismo a outras doenças imuno-relacionadas, tais como HIV, artrite reumatóide e rejeição cardíaca a enxertos (Tu, Eisen e Chang, 2010).

Estruturalmente, a serotonina apresenta excelente flexibilidade conformacional em sua porção alifática desempenhando um importante papel funcional na molécula (Pratungdejkul *et al.*, 2006), fornecendo os sítios de ligação deste receptor, sendo o conhecimento desta interação essencial no desenvolvimento de novas drogas. É conhecido que em pH fisiológico a serotonina encontra-se protonada, e apresenta vários conformêros diferentes, devido a flexibilidade da parte alifática (Pratungdejkul *et al.*, 2006). Na literatura há relatos de determinação de serotonina em amostras complexas por diferentes técnicas investigativas como espectrometria de massa (Guillen-Casla *et al.*, 2012), eletroforese capilar (Zinellu *et al.*, 2012), cromatografia líquida de alto desempenho (Samanidou *et al.*, 2012), e potenciometria (Khan, Nakanishi e Osaka, 2011). O espectro SERS da serotonina já foi apresentado na literatura (Tu, Eisen e Chang, 2010), contudo o estudo vibracional da adsorção desta biomolécula na superfície da NP não é apresentado no trabalho.

O estudo espectroscópico da serotonina livre está bem descrito por Bayari e colaboradores (Bayarı, Saglam e Ustundag, 2005). Neste trabalho foi investigada sua estrutura molecular, desde comprimentos e ângulos de ligações até, o espectro de infravermelho para esta biomolécula, utilizando para tanto diferentes níveis de teoria. Neste trabalho investiga-se ainda o efeito causado pelo solvente na posição e intensidade relativas das bandas, verificando-se que ocorrem mudanças espectrais quando se passa do estado sólido para o líquido, sendo observado inclusive a sobreposição de bandas ou até mesmo a ausência destas. Salienta-se ainda a presença tanto de grupos doadores quanto de receptores de elétrons na estrutura da serotonina, o que poderia facilitar a presença de ligações de hidrogênio e a interação com a superfície metálica.

### *Adrenalina*

A adrenalina (4-(1-hidróxi-2-[metilamino]etil)-1,2-benzenodiol) pertence à classe das catecolaminas, que são compostos químicos derivados do aminoácido tirosina. Podem atuar como hormônio e neurotransmissor em várias ações fisiológicas e patológicas (Tavana *et al.*, 2012). A adrenalina desempenha papel central durante stress físico ou mental, além de estimular uma série de ações do sistema nervoso simpático. A presença de adrenalina afeta a regulação da pressão sanguínea, frequência cardíaca, o sistema imunológico e o metabolismo do glicogênio e lipídios (sua presença na corrente sanguínea aciona mecanismos de mobilização de triacilglicerídeos para a produção de açúcar) (Tavana *et al.*, 2012).

Estas importantes funções vitais da adrenalina, também a classificam como um potente agente de dopagem, sendo por isso proibido em competições esportivas. Por outro lado, baixos níveis desta biomolécula no organismo tem sido associados com a doença de Parkinson, enquanto que altos níveis na urina ou no sangue podem indicar a presença de tumores (Tavana *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012). O cloridrato e hidrogeno tartarato de adrenalina são amplamente usados em soluções injetáveis para o tratamento de hipertensão, choque anafilático, e como vasoconstritor em formulações anestésicas para prolongar o efeito anestésico (Hoellein e Holzgrabe, 2012).

Deste modo, a determinação de adrenalina em níveis relativamente baixos de concentração é de grande interesse na área medicinal. Na literatura estão descritos processos de quantificação fazendo uso das mais variadas técnicas analíticas, tais como: eletroforese capilar (Xu *et al.*, 2012), eletroquímica (Zhou *et al.*, 2012) e cromatografia líquida de alto desempenho (Machida *et al.*, 2006). O espectro SERS da adrenalina já encontra-se descrito na literatura por dois grupos (Lee *et al.*, 1988; Dijkstra *et al.*, 2007), contudo nestes trabalhos a faixa de número de onda investigada é pequena, e não há estudo vibracional associado. Além disso, os espectros SERS foram obtidos com o uso de eletrodo ou coloide de prata. O estudo do espectro teórico da adrenalina livre foi recentemente reportado na literatura por Song e colaboradores (Song *et al.*, 2005).

*p-Fenilenodiamina*

A p-fenilenodiamina (1,4-diamino-benzeno) é um composto comumente encontrado em produtos para coloração capilar. Em pessoas extremamente sensíveis, este composto pode levar a alergia, dermatites e inchaços faciais severos, que podem ser erroneamente confundidos com angioedema (grandes vergões ou pápulas na superfície da pele) (Thyssen, White e European Society of Contact, 2008). No final do século XIX, uma epidemia alérgica de contato causada pela presença de p-fenilenodiamina em produtos capilares, levou países, como Suíça e França, a proibirem o uso de vários produtos (Thyssen, White e European Society of Contact, 2008). Atualmente, estima-se que 70% das tinturas capilares contenham p-fenilenodiamina, e a exposição a este alérgeno é bastante comum. A p-fenilenodiamina é capaz de ativar células T específicas, podendo sofrer acetilação em células do tecido epitelial, sugere-se que o processo de acetilação da p-fenilenodiamina pode levar a reação de desintoxicação da dermatite alérgica de contato (Nacak, Erbagci e Aynacioglu, 2006).

Encontra-se na literatura métodos para detecção da p-fenilenodiamina, entre os mais comuns tem-se, espectrometria de massas (Jahn *et al.*, 2012), eletroforese capilar (Dong *et al.*, 2009), cromatografia líquida de alto desempenho (Meyer, Bloemeke e Fischer, 2009) e amperometria (Dong *et al.*, 2008). Já é conhecido o SERS da p-fenilenodiamina adsorvida em superfície de ouro e prata (Koh, Greaves e Griffith, 1994), contudo o espectro SERS da p-fenilenodiamina ainda não foi determinado. É bem relatado na literatura a formação de complexos metálicos com a p-fenilenodiamina (Akalin e Akyüz, 2001; Yuste *et al.*, 2010), evidenciando a facilidade com que essa molécula se liga à superfícies metálicas. Além disso, a p-fenilenodiamina sofre oxidação espontânea em meio aquoso, formando um radical cátion (Chipman, Sun e Tripathi, 1992), bem como é um redutor conhecido (Breza, Kortišová e Cibulková, 2006), propriedades determinantes para a obtenção dos espectros SERS neste trabalho.

Os espectros vibracionais Raman e de absorção no infravermelho - experimental e teórico - da p-fenilenodiamina neutra e de seu radical catiônico já se encontram descritos na literatura, assim como a atribuição vibracional destas espécies livres (Chipman, Sun e Tripathi, 1992; Akalin e Akyüz, 2000). Os espectros eletrônicos - teóricos e experimentais - das duas espécies também são conhecidos (Bailey, Zink e

Nelsen, 2003). A atribuição vibracional da p-fenilenodiamina como ligante em diferentes complexos metálicos é descrita por Alkalin e Akyuz (Akalin e Akyüz, 2001).

### *L-carnosina*

A L-carnosina ( $\beta$ -alanil-histidina) é um dipeptídeo amplamente encontrado nos tecidos muscular e nervoso de mamíferos (Bellia, Vecchio e Rizzarelli, 2012). A espécie sintetizada nos músculos é capaz de controlar o nível de glicose no sangue, através de regulações do sistema nervoso autônomo (Maherani *et al.*, 2012). Além disso, a espécie apresenta propriedades biológicas de grande interesse, tais como: tampão fisiológico, antioxidante e na eliminação de radicais livres, agentes cicatrizante e quelante de metais (Aydın *et al.*, 2010; Boldyrev, 2012). As funções antioxidantes são propriedades com considerável apelo na indústria alimentícia atraindo interesse na síntese e desenvolvimento de biomoléculas que enriqueçam o valor terapêutico destes alimentos (Bellia, Vecchio e Rizzarelli, 2012).

Muito tem se falado a respeito da ação terapêutica da L-carnosina, incluindo efeitos contra a hipertensão, sua ação imunomoduladora (aumenta a resposta do sistema imunológico contra determinados microorganismos), ação anti-inflamatória, bem como no tratamento de isquemia (Bellia, Vecchio e Rizzarelli, 2012). Recentemente tem sido estudado o efeito dessa molécula inclusive no tratamento da doença de Alzheimer, e no retardamento do crescimento de células tumorais (Bellia, Vecchio e Rizzarelli, 2012).

Algumas propriedades biológicas da L-carnosina são diretamente dependentes da sua coordenação a alguns cátions metálicos (Wagner e Baran, 2008; Branham *et al.*, 2011). Esta biomolécula é um ligante do tipo polidentado, apresentando cinco sítios potenciais de coordenação – sendo estes dois nitrogênios imidazólicos, um grupo carboxilato, uma ligação peptídica, e um grupo amino terminal. Quanto à geometria de coordenação pode ser encontrado na literatura complexos tetraédricos e octaédricos, dependendo do cátion metálico, da razão metal-ligante utilizada na síntese e da força iônica da solução suporte (Branham *et al.*, 2011).

Inúmeros métodos de detecção de L-carnosina são descritos na literatura, entre eles podem ser citados a separação por eletroforese capilar (Zinellu *et al.*, 2011), cromatografia líquida de alto desempenho (Tsuruta *et al.*, 2010), espectroscopia de fluorescência (Rochat *et al.*, 2010) e espectrometria de massas (Fonteh, Harrington e



Harrington, 2007). Em relação ao espectro vibracional, foi reportado recentemente para esta molécula, seu espectro SERS em coloide de prata (Thomas *et al.*, 2010), neste trabalho foram descritos sua atribuição vibracional – livre e quando há formação de complexo de superfície com a prata. Outros trabalhos de atribuição vibracional Raman e de absorção no infravermelho da L-carnosina livre e/ou complexada com diferentes metais também é bastante citada na literatura (Torreggiani, Bonora e Fini, 2000; Torreggiani, Tamba e Fini, 2000; Torreggiani, Taddei e Fini, 2002; Torreggiani *et al.*, 2002; Wagner e Baran, 2008).

### *Melatonina*

A melatonina (N-acetil-5-metóxi-triptamina) é sintetizada principalmente pela glândula pineal no cérebro humano - a partir do aminoácido triptofano (Carpentieri *et al.*, 2012) – pode ser encontrada na retina, medula óssea, epitélio respiratório, pele e intestino (Carpentieri *et al.*, 2012). Possui inúmeras funções relacionadas com a regulação do ritmo cardíaco, promovendo interferências no metabolismo, sistema imunológico e até distúrbios de sono (Mercolini, Mandrioli e Raggi, 2012). Adicionalmente previne a formação de radicais livres, possuindo propriedades antioxidantes, o que faz da melatonina um ingrediente comumente encontrado em suplementos alimentares e influenciou consideravelmente o consumo *in natura* de uvas e vinhos (Mercolini, Mandrioli e Raggi, 2012). Embasando os estudos de atividade antioxidante, pesquisas recentes revelaram a inibição do aparecimento e desenvolvimento de células cancerígenas por esta biomolécula (Carpentieri *et al.*, 2012; Sanchez-Hidalgo *et al.*, 2012).

Agentes oxidantes “clássicos” são receptores de elétrons e podem ser regenerados em reações redox, as quais podem promover a formação de outras espécies oxidadas. Ao contrário dos agentes oxidantes clássicos, a melatonina parece interagir com radicais livres por reações de adição, e os produtos são mais estáveis e podem ser excretados como tais. Assim, a melatonina tende a não ser regenerada no organismo, não podendo participar de outras reações de redox (Mercolini, Mandrioli e Raggi, 2012).

Os métodos mais utilizados para a detecção de melatonina são a cromatografia líquida de alto desempenho e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de

massas (Jensen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Mercolini, Mandrioli e Raggi, 2012; Wang, Chung-Davidson *et al.*, 2012; Wang, Walaszczyk *et al.*, 2012), contudo há trabalhos que fazem uso de outras técnicas como eletroforese capilar (Mandrioli *et al.*, 2011) e potenciometria (Khan, Nakanishi e Osaka, 2011). O estudo das atribuições vibracionais no espectro de absorção no infravermelho da melatonina livre é descrito em alguns trabalhos (Bayari e Ide, 2003; Dian *et al.*, 2004), sendo que o espectro Raman para esta molécula ainda não foi reportado.

A capacidade quelante desta biomolécula também está descrita em inúmeros artigos e até em algumas patentes (Kossor; Limson, Nyokong e Daya, 1998; Lack, Daya e Nyokong, 2001; Gulcin, Buyukokuroglu e Kufrevioglu, 2003), evidenciando a facilidade com que esta se coordena a metais. Contudo o espectro SERS desta molécula ainda não foi descrito na literatura.

### *Rifampicina*

A rifampicina (3-(4-metil-piperazinil-iminometil)rifamicina) é uma droga semi-sintética usada principalmente no tratamento contra tuberculose, sendo um agente bactericida contra a atividade de *Mycobacterium tuberculosis* (Liu *et al.*, 2012). O modo de ação desta droga se baseia na inibição da polimerase (enzima que catalisa a polimerização de ácidos nucleicos) do RNA, o antibiótico age seletivamente na polimerase bacteriana pela ligação em algumas de suas subunidades, esse mecanismo impede a síntese proteica na célula bacteriana (Liu *et al.*, 2012). O tratamento da tuberculose é longo, com duração de aproximadamente um ano, e além da rifampicina faz-se uso concomitante de outras drogas, tais como a isoniazida, a pirazinamida e o etambutol (Manabe *et al.*, 2012). Também tem sido reportado, o uso deste fármaco (rifampicina) no tratamento de icterícia e prurido em pacientes com colesterase intra-hepática benigna, um raro distúrbio autossômico recessivo (Mizuochi *et al.*, 2012). Outra doença na qual o uso da rifampicina tem sido amplamente empregado é no tratamento da brucelose em humanos, cujo mecanismo de ação é semelhante ao da tuberculose (Sandalakis *et al.*, 2012).

Infelizmente, pode ser facilmente desenvolvida resistência à rifampicina, devido à mutações nas subunidades em que o antibiótico é reconhecido dentro do organismo e que desfavorecem a ligação da rifampicina (Sandalakis *et al.*, 2012). Segundo a

Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008, existiam 440.000 casos de resistência ao tratamento multi-droga contra tuberculose (Dixit *et al.*, 2012). Na maioria dos casos, a resistência se deve a não observância do regime terapêutico ou a interrupção do tratamento (Melo, Queiroz e Queiroz, 2011).

O uso da rifampicina pode produzir uma série de efeitos colaterais, como toxicidade hepática, erupções alérgicas, perda de apetite, náusea, e distúrbios imunológicos (Melo, Queiroz e Queiroz, 2011). O acompanhamento terapêutico permite a determinação da melhor dosagem para cada paciente, otimizando os benefícios terapêuticos e minimizando a ocorrência de efeitos colaterais. Atualmente, os níveis de rifampicina no plasma sanguíneo de pacientes com tuberculose não são rotineiramente monitorados, embora esteja claro que esse procedimento é vantajoso para o tratamento (Melo, Queiroz e Queiroz, 2011). Na literatura encontra-se reportado o uso de diferentes métodos de quantificação para a rifampicina, como por exemplo cromatografia líquida de alto desempenho (Fox *et al.*, 2011), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Oswald *et al.*, 2011) e eletroforese capilar (Pontarolo *et al.*, 2010).

O espectro Raman e SERS da rifampicina foi reportado por Howes e colaboradores (Howes *et al.*, 2006; Howes *et al.*, 2007) sendo utilizado coloide de prata para a obtenção dos espectros SERS. A atribuição dos modos vibracionais foi feita pela comparação com outras estruturas semelhantes disponíveis na literatura, em combinação com as mudanças espectrais quando solvente deuterado foi usado.

#### *Albumina Sérica Bovina (BSA)*

A BSA é uma proteína globular de estrutura bastante conhecida, trata-se de uma única cadeia polipeptídica com peso molecular em torno de 66kDa contendo 583 aminoácidos (Ru *et al.*, 2012). É uma biomacromolécula que contém grupos carboxila e amina em sua estrutura, podendo ser empregada em inúmeras aplicações biomédicas (Won *et al.*, 2012). Estudos mostram que a BSA possui alta similaridade com a albumina de soro humano (HSA), tanto na sequência de aminoácidos, quanto na conformação (Sathyadevi *et al.*, 2012), justificando assim o crescente interesse nesta proteína.

Esta proteína exibe comportamento extraordinário devido a sua organização estrutural e adaptação conformacional que juntos originam uma variedade de sítios de

ligação para outras moléculas, por exemplo, ácidos graxos, hormônios e drogas (Curvale, Debattista e Pappano, 2012). A característica mais relevante do BSA é a habilidade de se ligar reversivelmente a uma ampla variedade de substâncias endógenas e exógenas formando complexos não covalentes que atuam como carreadores não específicos no plasma (Curvale, Debattista e Pappano, 2012).

Está bem descrito na literatura a afinidade desta proteína com diferentes sítios metálicos formando complexos carreadores de substâncias pelo plasma sanguíneo (Iosin, Canpean e Astilean, 2011; Mariam, Dongre e Kothari, 2011; Sharma *et al.*, 2012). Também há relatos na literatura, sobre a facilidade com que essa proteína se liga a moléculas que contenham átomos de enxofre, por exemplo, tióis (Chen *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Vangala *et al.*, 2012). Os espectros SERS do BSA em coloide de ouro foram reportados por Iosin e colaboradores (Iosin *et al.*, 2009; Iosin, Canpean e Astilean, 2011), evidenciando a potencialidade destas NPs na investigação da desnaturação da proteína, bem como sua análise conformacional.

## **1.2 A espectroscopia Raman e o efeito SERS**

O estudo das vibrações moleculares fornece informações sobre a estrutura eletrônica e o arranjo atômico em uma molécula. Os espectros vibracionais permitem, a partir da análise do padrão das bandas, frequências e intensidades relativas, obter informações da estrutura molecular, conformações e até do ambiente químico da espécie molecular em questão (Sant'ana, 2005). Juntamente com a espectroscopia de absorção no infravermelho, a espectroscopia Raman é uma das técnicas de investigação vibracional amplamente utilizada na caracterização de materiais, apresentando notáveis vantagens em relação a outras técnicas vibracionais (Andrade, 2007). Dentre as vantagens proporcionadas pela espectroscopia Raman, pode-se citar: a análise em solução aquosa, já que a água é um espalhador fraco, a possibilidade de obtenção de espectros *in situ* de forma não destrutiva, além da investigação vibracional em números de onda menores, sem a necessidade de instrumentação adicional. No entanto, o espalhamento Raman ordinário apresenta baixa seção de choque, tipicamente  $10^{-30}$  –  $10^{-25}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$  (Kneipp *et al.*, 1999). A pequena seção de choque requer um número grande de moléculas para realizar medidas adequadas, o que torna a técnica relativamente pouco sensível. Contudo efeitos de intensificação como os observados nas

variantes Raman ressonante (RR) e o SERS levam a um aumento da sensibilidade da técnica.

O Raman ressonante é um efeito de acoplamento vibrônico, observado quando há coincidência (ressonância) entre o comprimento de onda da linha laser excitante e uma transição eletrônica da molécula, ocorrendo intensificação dos modos vibracionais associados ao grupo cromofórico que absorve próximo àquele comprimento de onda (Aroca, 2006).

No efeito SERS, a ressonância ocorre entre a radiação excitante e a banda LSPR das NPs metálicas, levando a uma intensificação que pode chegar a  $10^{11}$  vezes (Etchegoin, 2009).

O efeito SERS foi descoberto por Fleischmann et al (Fleischmann, Hendra e Mcquillan, 1974), ao estudarem piridina adsorvida sobre eletrodo de prata, o qual teve a rugosidade aumentada por ciclos sucessivos de oxidação e redução. A intensificação do sinal foi atribuída ao aumento da área superficial do eletrodo, e os espectros obtidos sofriam variações nas intensidades relativas e frequências vibracionais com a mudança no potencial aplicado. Mais tarde, dois trabalhos foram publicados independentemente, por Jeanmarie e Van Duyne (Jeanmaire e Van Duyne, 1977) e por Albrecht e Creighton (Albrecht e Creighton, 1977), mostrando que o aumento da intensidade observado para algumas bandas no espectro, não poderia ser justificado apenas pelo aumento da área superficial do eletrodo. A intensificação observada era da ordem de  $10^6$  vezes, enquanto que a intensificação referente ao aumento da área seria da ordem de  $10^2$  vezes.

Caracterizado um novo efeito, inúmeros trabalhos foram realizados para diferentes sistemas, e para outros metais além da prata, principalmente ouro e cobre. A espectroscopia SERS tornou-se, então, uma técnica de superfície, através da qual é possível determinar a identidade e a orientação de moléculas adsorvidas à superfície do substrato metálico. O crescente interesse no uso do SERS como uma técnica experimental, fez aumentar o empenho na elucidação das causas da intensificação.

A interpretação dos espectros SERS pode apresentar elevado grau de complexidade, já que o espectro é resultado de fatores variados, e que na maioria das vezes são de difícil controle. Portanto é importante conhecer e analisar cuidadosamente

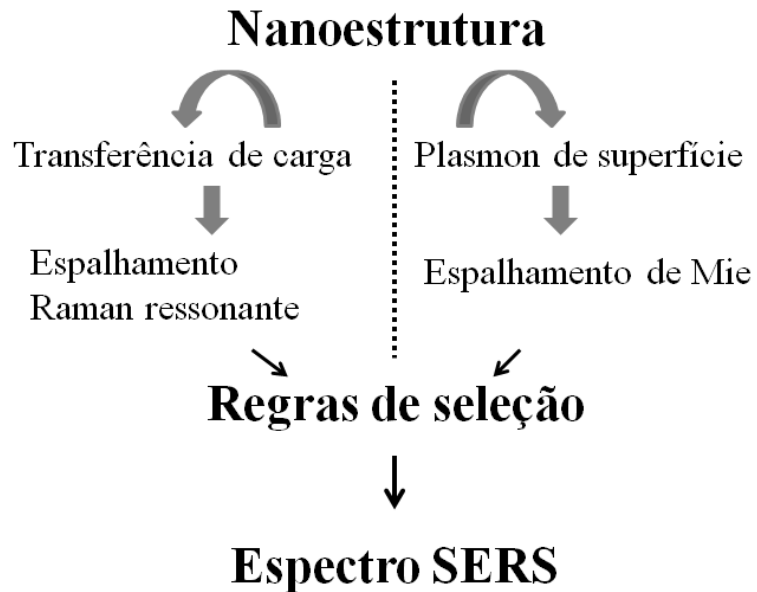
o conjunto de possíveis variáveis que podem afetar o espectro SERS observado. Alguns aspectos devem ser levados em consideração ao se interpretar o espectro (Aroca, 2006):

- A molécula está interagindo com uma nanoestrutura metálica. O processo de adsorção pode ser dividido em duas categorias, de acordo com a força da ligação entre a partícula e o substrato. No processo de adsorção física (ou fisissorção), a interação é fraca, com energias de adsorção bem abaixo do encontrado para ligações químicas convencionais. Este tipo de adsorção pode alterar a estrutura molecular na superfície de sólidos, mas não nos metais. Quando a energia de adsorção é grande o suficiente e comparável a energia de ligações químicas, o termo quimissorção é usado.
- Fótons incidentes podem induzir a excitação do substrato, tal como par “elétron-buraco” devido à excitação do plasmon de superfície, estes podem estar envolvidos em processos de intensificação foto-induzidos. Estes podem gerar efeitos fotoquímicos indesejáveis no analito de interesse, como por exemplo, fotodecomposição, fotodissociação e fotodessorção. Todos estes processos podem influenciar o espectro SERS obtido.
- A interação da luz com a nanoestrutura metálica depende da ressonância entre a frequência incidente e o plasmon de superfície, que por sua vez depende da forma e da estrutura das NPs metálicas. Logo, a intensidade SERS é também influenciada por estes fatores. Adicionalmente, a excitação em nanoestruturas é fortemente influenciada pela constante dielétrica do meio.
- A dinâmica da interação da luz com o adsorbato conduz a um padrão de intensidades Raman determinado pelas regras de seleção. Aqui, é importante distinguir as regras de seleção de transições vibracionais para uma molécula em fase gasosa, onde as atividades Raman e infra-vermelha são facilmente determinadas pela simetria do grupo de ponto, e as regras de seleção de superfície para uma molécula fixa, especialmente orientada na superfície da nanoestrutura. As regras de seleção de superfície abrangem as propriedades de simetria das transições de dipolo e a modificação das intensidades devido a componentes do vetor campo elétrico na superfície. Elas se aplicam a moléculas ancoradas em nanoestruturas, uma vez que a molécula adsorvida geralmente pertence a um grupo de ponto de simetria distinto da molécula livre, e os correspondentes modos permitidos e sua polarização são também diferentes.

- O espectro SERS é comumente obtido pela excitação da luz na região do visível ou infravermelho. A presença da nanoestrutura metálica pode permitir novas excitações do complexo molécula/nanoestrutura, tais como transição de transferência de carga entre os níveis de Fermi do metal e o primeiro estado excitado da molécula. Uma vez que a excitação esteja em ressonância com a transição eletrônica do complexo metálico adsorvido, o espalhamento inelástico observado se refere ao efeito químico.
- Quando o adsorbato possui transição eletrônica própria em ressonância com a radiação excitante o SERS observado pode ser de fato espalhamento Raman ressonante adicionado ao efeito SERS (SEERS – *Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*), e as intensidades relativas observadas podem não coincidir com o espectro Raman da molécula livre.
- Finalmente, o sinal de pequenas quantidades de impurezas podem aparecer no espectro, trazendo complicações na interpretação dos espectros SERS observados.

A despeito das múltiplas variáveis associadas ao SERS, existe uma concordância em aceitar dois modelos que permitem a elucidação do efeito, o modelo eletromagnético e o químico. O mecanismo eletromagnético, responsável pela intensificação do campo elétrico incidente e espalhado, devido à ressonância entre a radiação incidente e a frequência do plasma de superfície do metal (LSPR). E o mecanismo químico, que envolve a interação entre o adsorbato e a superfície metálica. Há várias revisões na literatura apresentando os diferentes mecanismos envolvidos no efeito SERS (Moskovits, 1985; De Faria, Temperini e Sala, 1999; McNay *et al.*, 2011). e todas aceitam que tanto o mecanismo químico (Otto, 2005) quanto o eletromagnético (Hao e Schatz, 2004; Itoh *et al.*, 2011) estão envolvidos no efeito de intensificação do sinal Raman, visto que separadamente eles não podem justificar a magnitude do efeito.

Na Figura 2 está apresentado um fluxograma dos efeitos que contribuem mais significativamente para observação do SERS.



**Figura 2:** Fluxograma apresentando as mais significantes contribuições para o efeito SERS (Aroca, 2006) (adaptado).

### 1.2.1 O efeito eletromagnético

O SERS pode ser entendido como um fenômeno associado com a intensificação do campo elétrico em torno de pequenos objetos metálicos, devido principalmente à oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução (LSPR – *Localized Surface Plasmon Resonance*). Durante a efeito tanto a radiação incidente quanto a radiação espalhada sofrem intensificação do campo. (Douketis *et al.*, 2000). Sob circunstâncias apropriadas o campo pode ser intensificado em uma escala de  $E^4$ , onde  $E$  é o campo eletromagnético local (Aroca, 2006), esta relação pode ser explicitada de acordo com a equação 1 (Kneipp *et al.*, 1999), onde  $I_{\text{SERS}}(\nu_s)$  é a intensidade do sinal SERS;  $N$  é o número de moléculas envolvidas no efeito SERS;  $I(\nu_L)$  é a intensidade da radiação excitante;  $A(\nu_L)$  é o campo elétrico da radiação incidente;  $A(\nu_s)$  é o campo elétrico da radiação espalhada;  $\sigma_{\text{ads}}^{\text{R}}$  é a seção de choque Raman da molécula adsorvida.

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

**Equação 1**



A absorção e o espalhamento de luz por NPs metálicas é considerado a propriedade mais importante que dá origem ao SERS (Aroca, 2006), pois a ressonância de plasmon de superfície em nanoestruturas é condição necessária para a observação do efeito.

O fenômeno físico envolvido na ressonância de plasmon de superfície é amplamente discutido na literatura, e será detalhadamente tratado na seção 1.3. No entanto, de modo geral tem-se a submissão de uma NP isolada à radiação eletromagnética, esta se torna polarizada pelo seu próprio campo elétrico, produzido pelo deslocamento coletivo dos elétrons em relação ao núcleo. Este campo gerado nas proximidades da NP é o responsável pela intensificação do sinal SERS de moléculas próximas à superfície metálica.

A ressonância de plasmon de superfície pode ser modulada pela forma e tamanho da NP, e também pela constante dielétrica do meio externo. Portanto, o mecanismo eletromagnético guia a preparação da estrutura da superfície, de modo a obter o efeito de intensificação em uma frequência de excitação particular. Isto significa que intensificadores pobres em uma região podem fornecer intensificação adequada em outra região do espectro. Os experimentos SERS são casos específicos, e cada problema requer modelagem das condições experimentais para maximizar a relação sinal-ruído ou maximizar o limite de detecção do respectivo analito.

Além da ressonância do plasmon de superfície, outros dois mecanismos foram inicialmente propostos para a contribuição na intensificação do sinal pelo efeito eletromagnético (Gersten e Nitzan, 1980). Primeiramente, o modelo de dipolo-imagem (*image field*), no qual o dipolo elétrico intrínseco da molécula adsorvida levaria ao aparecimento de um dipolo induzido na superfície metálica. Quando alinhados, a soma de ambos levaria a um dipolo resultante maior, e quando paralelos a resultante seria nula. Contudo, o campo elétrico somente pode sofrer intensificação devido ao campo-imagem para distâncias menores que  $1 \text{ \AA}$  (Andrade, 2007), ou seja, menores que a distância de uma ligação química convencional. Como a proximidade do adsorbato à superfície é superior a esta distância, este efeito não deve contribuir consideravelmente na intensificação do sinal.

O segundo mecanismo proposto leva em conta a curvatura dos sítios de adsorção nos aglomerados metálicos, no qual há concentração do campo eletromagnético nas regiões de alta curvatura das NPs (Kelly *et al.*, 2002; Hao e Schatz, 2004). Partículas esféricas apresentam um excelente sistema modelo, e soluções exatas estão disponíveis para sua interação com a radiação eletromagnética (Kerker, 1969). No entanto, evidências experimentais apontam que os melhores intensificadores não são NPs esféricas, e sim estruturas de diferentes formas, particularmente agregados de NPs ou estruturas fractais.

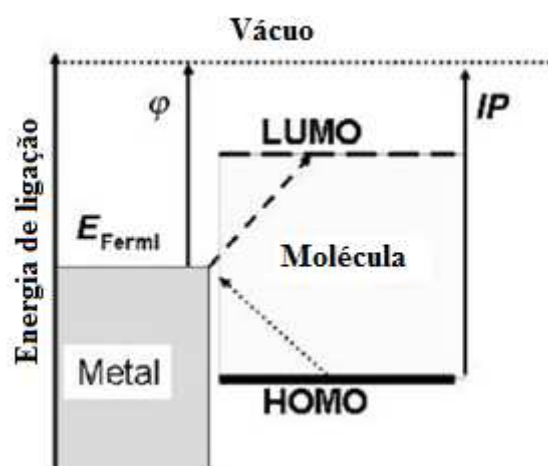
A interpretação do efeito eletromagnético é baseada na ideia de “nano-ressonadores” (Aroca, 2006). Estas nanoestruturas podem ser esferas sólidas, estruturas sólidas de diferentes formas (elipsóides, triângulos, cilindros, etc.) ou agregados de nanopartículas (ou estruturas fractais). É imediatamente evidente que enquanto uma esfera absorve a uma frequência particular, um esferóide pode absorver em três frequências diferentes, e uma estrutura fractal pode ressonar em qualquer frequência dada, dentro de uma ampla região espectral (Shalaev *et al.*, 1998). Os pontos localizados de pequenas dimensões - menores do que o comprimento de onda da radiação incidente - são a fonte do campo local extremamente alto, e podem produzir fatores de intensificação da ordem de  $10^{12}$  ou maior. Os chamados “*hot spots*” do efeito SERS podem ser dímeros de NPs alinhados com a radiação incidente, gerando um campo elétrico local de enorme magnitude na região inter-partícula responsável pela possibilidade de identificação de uma única molécula.

### **1.2.2 O efeito químico**

O efeito eletromagnético é fundamental para a observação do SERS, sem este efeito não haveria sinal. Contudo o mecanismo químico determina o que é observado (Otto, 2005). O espectro SERS contém informações sobre adsorbato e o ambiente químico, em particular as interações com a NP e a orientação espacial. Observa-se considerável dependência entre o fator de intensificação SERS com o adsorbato e com o modo vibracional (Andrade, 2007). Um exemplo desta dependência foi verificado ao observar que o espectro SERS do monóxido de carbono (CO) em eletrodo de Ag é cerca de 200 vezes mais intenso do que o espectro do N<sub>2</sub>, sendo que a secção de choque Raman para as duas moléculas livres é praticamente a mesma (Tian, Ren e Wu, 2002).

O espectro SERS de espécies quimissorvidas requer nova análise vibracional, uma vez que se pode ter um espectro completamente diferente do obtido para a molécula livre, sendo que os valores de frequência e intensidades relativas podem mudar consideravelmente. Entretanto, do ponto de vista da intensificação, a ligação direta com a superfície pode aumentar o fator de intensificação. Este novo espectro SERS pode apresentar bandas seletivamente intensificadas, por exemplo dos modos associados ao sítio de adsorção.

Os modelos de transferência de carga assumem que a adsorção de espécies moleculares em superfícies metálicas causa uma perturbação nos estados eletrônicos do adsorbato, alargando a distribuição energética dos níveis eletrônicos (Andrade, 2007). Após o processo de adsorção a energia do nível de Fermi do metal se encontra entre o estado ocupado de menor energia (HOMO) e o primeiro estado excitado desocupado (LUMO). A excitação do laser traz a possibilidade de transição de transferência de carga entre o nível de Fermi da nanoestrutura e o LUMO da molécula adsorvida, que podem ser transferências do metal para molécula ou da molécula para o metal. O diagrama de energia envolvido no efeito químico é ilustrado na Figura 3, onde IP é o potencial de ionização do adsorbato,  $\phi$  é a função trabalho do metal, e o nível de Fermi possui energia entre os níveis HOMO e LUMO do adsorbato. Quando a linha laser incidente está em ressonância com a energia da banda de transferência de carga, tem-se o efeito de intensificação químico do SERS.



**Figura 3:** Diagrama de energia ilustrando a energia da banda da nanoestrutura metálica, e a diferença entre os níveis HOMO e LUMO da molécula adsorvida (Aroca, 2006) (adaptado).

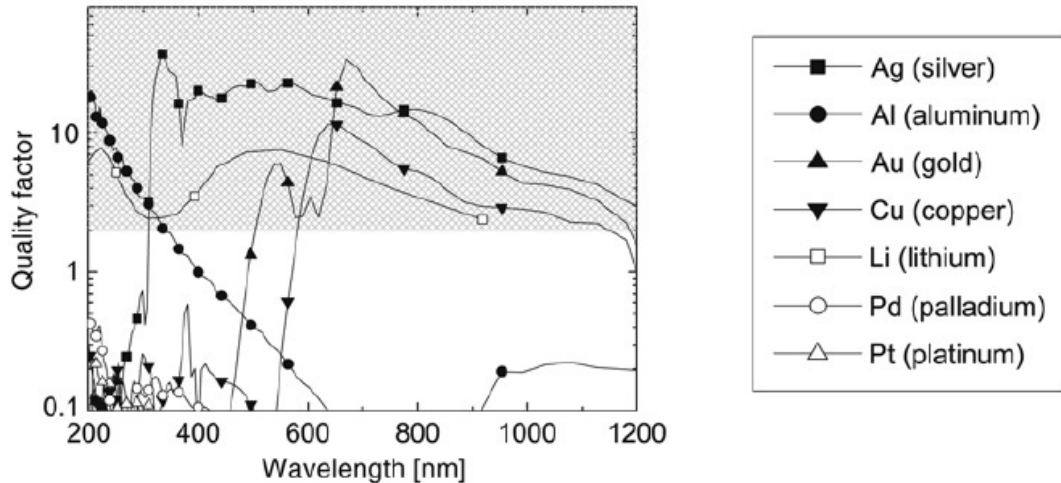
### **1.3 O efeito de ressonância de plasmon de superfície localizado**

Metais no estado de valência igual a zero apresentam uma grande deslocalização espacial dos elétrons. Nesta condição, pode haver a excitação coletiva destes elétrons pela incidência de radiação eletromagnética de comprimento de onda adequado. Esta excitação coletiva recebe o nome de plasma, e o quantum associado a essa transição, de plasmon (Andrade, 2007). Plasmon estão no centro do efeito de intensificação SERS pelo modelo eletromagnético. Muitas das propriedades de metais como ouro, prata, cobre e alumínio, estão relacionadas com a presença dos elétrons de condução. É a resposta do plasmon que rege todas as propriedades óticas do metal.

Gustav Mie tentando explicar a coloração de uma amostra de água contendo pequenas partículas de ouro resolveu de forma plena as equações de Maxwell para uma partícula esférica submetida a um campo eletromagnético (Etchegoin, 2009). O resultando é a Teoria de Mie, que descreve o espectro de extinção (absorção + espalhamento de luz) para partículas desta geometria (Etchegoin, 2009). A localização da frequência de oscilação no espectro eletromagnético é determinada pela função dielétrica do metal, tamanho e forma da NP metálica, bem como depende do índice de refração do meio.

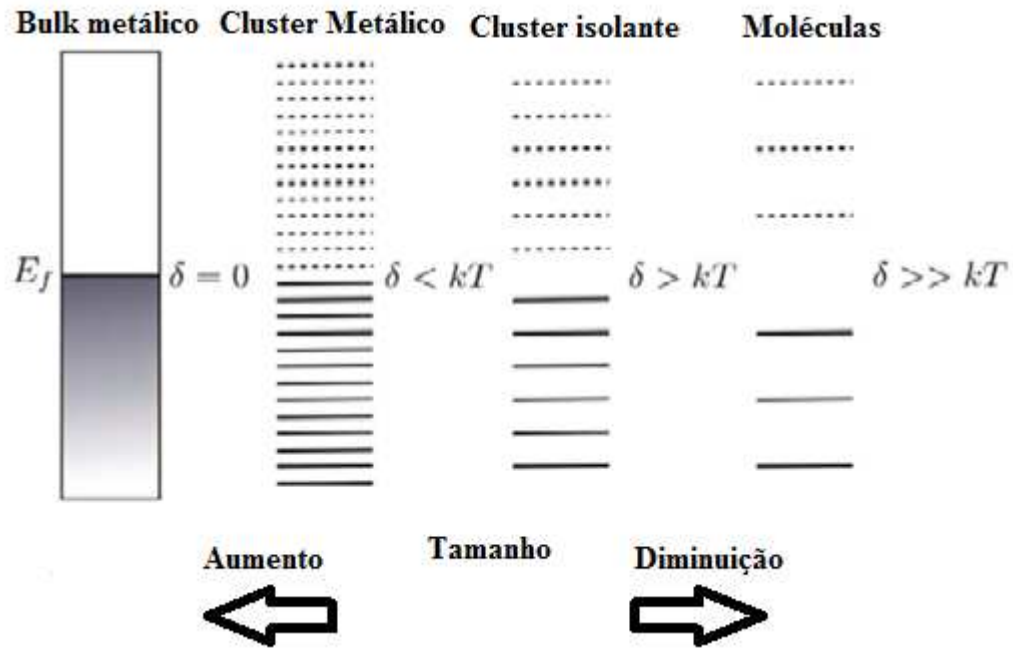
A função dielétrica do metal é diretamente dependente da frequência natural de oscilação do plasmon de superfície, e é devida em uma parte real e uma parte imaginária. Para que o metal seja um bom substrato SERS, a parte real da função dielétrica deve ser negativa, e parte imaginária deve apresentar um valor pequeno (Etchegoin, 2009). Deste modo somente alguns metais são promissores para observação do efeito, marcadamente os metais de cunhagem, como prata, ouro e cobre. Ainda com relação à parte real e imaginária da função dielétrica, há como se calcular o fator de qualidade, que mostra para um determinado metal, qual a região espectral mais adequada para a obtenção do espectro SERS. O fator de qualidade para o metal em uma determinada região deve apresentar um valor maior que dois, para que o metal seja adequado para obtenção do espectro SERS. O valor do fator de qualidade para diferentes metais é apresentado na Figura 4, por exemplo, para o ouro a partir de 500 nm já é possível a obtenção do espectro SERS. Embora nesta região do visível, o espectro SERS em superfície metálica de ouro seja de difícil obtenção, existem trabalhos reportados na literatura em que o espectro SERS foi obtido nesta radiação

excitante (Yang *et al.*, 2008; Castillo, De La Rosa e Perez, 2011; Merlen *et al.*, 2011). Já para a prata, praticamente toda região do visível e infravermelho próximo apresenta o valor do fator de qualidade adequado.



**Figura 4:** Valor previsto para o fator de qualidade de diferentes metais ao longo da faixa de comprimentos de onda de 200 a 1200 nm (Etchegoin, 2009).

A forte dependência entre a posição da banda no espectro de extinção e o tamanho da NP metálica se deve à diferença energética entre a banda de valência e de condução do metal. Quando a luz atinge a superfície metálica os elétrons em um nível de menor energia podem ser excitados para um nível de energia mais alto. Num modelo a partir de átomos discretos, quando quatro átomos se combinam, os níveis de energia se fundem, oferecendo quatro níveis de energia mais baixos e quatro níveis mais elevados (teoria de formação de orbitais moleculares). Com o aumento do número de átomos vizinhos, o espaçamento entre os níveis de energia diminui, ou seja, menos energia é necessária para o elétron ser excitado de uma faixa para outra. Nos metais, quando um grande número de átomos estão próximos uns dos outros, as bandas de baixa e alta energia podem se sobrepor, formando uma faixa contínua entre os níveis de energia disponíveis, onde os elétrons podem se mover livremente. A Figura 5 ilustra esta abordagem, conforme se aumenta o número de átomos a diferença de energia entre os níveis diminui, até que se tenha a banda de condução da estrutura metálica estendida.



**Figura 5:** Evolução da densidade e diferença de energia entre níveis conforme o número de átomos do sistema aumenta (Morton, Silverstein e Jensen, 2011) (adaptado).

Como já explicitado anteriormente o comprimento de onda máximo da banda de absorção do plasmon de superfície localizado do espectro de extinção das NPs metálicas é sensível à constante dielétrica do meio, e por isso mudanças no ambiente local, tal como presença de espécies adsorvidas, podem causar deslocamento neste máximo. Isto permite a detecção de moléculas em uma concentração extremamente baixa, já que pequenas concentrações podem levar a deslocamentos observáveis da banda LSPR (Chung *et al.*, 2011).

#### **1.4) Modelagem Quântica**

O uso de cálculos quânticos para obtenção de espectros SERS teóricos é uma técnica análise dos espectros comum atualmente (Pergolese, Muniz-Miranda e Bigotto, 2009; Thomas *et al.*, 2010; Cárcamo *et al.*, 2012). A interpretação dos dados experimentais é facilitada pela eficiência dos programas computacionais, capazes de prever com confiança propriedades como frequências de modos normais e intensidades das bandas espectrais. Os avanços computacionais têm feito dos cálculos quânticos em química uma importante ferramenta para os espectroscopistas, facilitando a análise e

atribuição vibracional dos espectros. Dentro do efeito SERS, os cálculos teóricos ajudam na determinação dos sítios e da geometria de adsorção da espécie adsorvida.

O espectro SERS teórico foi obtido através de cálculos quânticos de complexos formados pela interação química da molécula em análise com um átomo do metal. Opcionalmente podem ser utilizados mais de um átomo ou um aglomerado de átomos, cuja estrutura foi previamente otimizada.

## **2- OBJETIVOS**

- Síntese de nanopartículas anisotrópicas de ouro ou cobre em suspensões aquosas, com controle sobre dispersão de tamanhos, para obtenção de NPs com LSPR em ressonância com a radiação excitante em 1064nm;

- Obtenção de imagem das nanopartículas em suspensão aquosa ou fixas sobre o vidro por microscopia eletrônica;

- Obtenção dos espectros LSPR das suspensões de nanopartículas na presença e na ausência dos adsorbatos: serotonina, melatonina, adrenalina, L-carnosina, cristal violeta, e BSA (Bovine Serum Albumin);

- Obtenção dos espectros Raman SERS destes compostos, com radiações excitantes em 1064 nm e 632,8nm.

- Obtenção do espectro vibracional calculado para cada um dos adsorbatos e do complexo formado entre estes e o metal.



### **3 - PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Equipamentos**

Para o desenvolvimento deste projeto utilizou-se a infraestrutura disponível no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFJF, e também a infraestrutura disponível em outras instituições, com as quais projetos de parceria foram firmados (CETEM/RJ, INMETRO/RJ, LEM-IQ/USP). Em conjunto, foi possível a utilização dos seguintes equipamentos:

- Espectrômetro FT-Raman Brucker RFS 100 equipado com um detector de germânio, resfriado por nitrogênio líquido, e com laser Nd:YAG com radiação excitante em 1064 nm.
- Espectrômetro Raman Renishaw inVia Reflex com radiação excitante em 632,8 nm (USP).
- Espectrômetro Raman LabRam Horiba com radiação excitante em 514,5 e 632,8 nm (CETEM).
- Espectrômetro Raman Explora Horiba com radiação excitante em 638,0 nm.
- Espectrofotômetro Shimadzu modelo UVPC 3101 na faixa de 200 a 3200 nm (USP).
- Espectrofotômetro Shimadzu modelo UVPC 1800 na faixa de 190 a 1100 nm.
- Analisador de Potencial Zeta ZetaPlus – Brookhaven equipado com um laser em 570 nm e espalhamento dinâmico de luz a 90°.

As imagens de microscopia eletrônica foram realizadas pelos colaboradores Lídia Ágata de Sena e Bráulio Soares Archanjo, todos do INMETRO/RJ. Para tais medidas foram utilizados o seguinte equipamento:

- Microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (FEI), modelo Magellan 400L.

## **3.2 Materiais e Métodos**

### **3.2.1 Síntese das nanopartículas de prata (AgNPs)**

Para a obtenção das nanopartículas nucleadoras de prata seguiu-se o procedimento descrito por Creighton *et al* (Creighton, Blatchford e Albrecht, 1979), no qual adicionou-se a um erlenmeyer 30 mL de solução aquosa  $3,33 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), e gotejou-se 10 mL de solução aquosa  $7,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ . A síntese foi feita sob agitação magnética e em banho de gelo, sendo que a cada 1,0 mL adicionado, o erlenmeyer foi agitado manualmente e recolocado no banho de gelo por 10 segundos antes da próxima adição, para evitar a agregação. Ao fim da síntese observou-se a formação de uma suspensão coloidal translúcida de coloração amarela.

### **3.2.2 Síntese das nanopartículas de prata com núcleo de sílica ( $\text{SiO}_2@Ag$ )**

A síntese das NPs de  $\text{SiO}_2@Ag$  foi adaptada do trabalho de Oldenburg e colaboradores (Oldenburg *et al.*, 1999). Esta síntese foi feita em três etapas: preparou-se as NPs de sílica e de prata separadamente, e posteriormente, as primeiras foram recobertas com as segundas.

Etapa 1: Em 50 mL de uma solução etanólica (proporção 2:3 de água:etanol) foi adicionado 1,5861 g de NPs de sílica (10-20 nm) compradas da Sigma-Aldrich®. Em seguida foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de mercapto-propil-trimetóxi-silano (MPTMS), e a mistura foi aquecida a 80°C por 4 horas, sendo o etanol repostado quando necessário. Após o fim da síntese, o coloide foi submetido a cinco ciclos de centrifugação de 30 minutos cada (taxa de 11500 rpm). A redispersão do coloide foi feita em etanol, e com isso pode-se eliminar todos os reagentes residuais.

Etapa 2: Separadamente, foram preparadas as NPs nucleadoras de prata, do seguinte modo: em um erlenmeyer, sob agitação constante e em banho de gelo, foi adicionado 50,0 mL de solução aquosa  $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ , seguido da adição de 1 mL de solução aquosa  $3,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  de citrato de sódio di-hidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A esta mistura adicionou-se lentamente 1,0 mL de solução aquosa  $2,1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaBH}_4$ .

Etapa 3: Finalmente, para um volume de 50,0 mL de NPs nucleadoras de prata foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  das NPs de sílica, e o sistema foi deixado sob agitação constante por 4h. Este coloide foi submetido a dois ciclos de centrifugação de 30 minutos cada (taxa de 6000rpm), e a redispersão foi feita em água.

### **3.2.3 Síntese das nanopartículas de ouro**

As sínteses do coloide de ouro foram feitas de seis diferentes modos, variando-se, por exemplo, proporção molar entre os reagentes, velocidade e ordem de adição dos mesmos, bem como a temperatura em que a síntese foi feita. Todas as sínteses de NPs de ouro propostas neste trabalho são inéditas.

#### *Método Um (M1)*

A síntese baseada no método 1 foi feita em banho em gelo e sob agitação magnética constante. Em um erlenmeyer foi adicionado 2,4 mL de AgNPs a 40,0 mL de solução aquosa  $5,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaBH}_4$ , seguida da adição de 5,0 mL de solução aquosa  $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de ácido cloro áurico trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). A adição do Au (III) foi feita bem lentamente, a uma taxa de gotejamento de  $50 \mu\text{L}$  a cada 5 minutos. Ao final foi adicionado 1 mL de solução aquosa  $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de citrato de sódio dihidratado. Com as primeiras adições de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , o coloide apresentou coloração vermelha, sendo ao que fim da síntese obteve-se uma suspensão coloidal translúcida e de coloração cinza. Este coloide se manteve estável por semanas quando armazenado sob refrigeração, e agregou após 15 dias quando armazenado sem refrigeração.

#### *Método Dois (M2)*

A síntese feita segundo o método 2 manteve as mesmas condições em que a M1 foi realizada, sendo que diferentemente no M2 não foi adicionado citrato de sódio ao fim da síntese. A aparência visual do coloide obtido segundo M2 foi a mesma do que se obteve para o M1, sendo que o coloide M2 é menos estável, pois mesmo armazenado sob refrigeração ocorreu agregação após alguns dias.

#### *Método três (M3)*

No método três propõem-se uma síntese em temperatura ambiente, e com agitação magnética constante. Neste procedimento 1,0 mL de AgNPs foi adicionado a

10,0 mL de água deionizada, seguido da adição de 1,2 mL de solução aquosa  $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Foi então adicionado, gota a gota, 900  $\mu\text{L}$  de solução aquosa  $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaBH}_4$ . Com a adição do Au (III) às AgNPs, a suspensão se tornou transparente, sendo que após o acréscimo do sal redutor obteve-se a coloração vermelha intensa. Este coloide permaneceu estável por semanas, armazenado sob refrigeração.

#### *Método quatro (M4)*

À semelhança do proposto no M3, a síntese descrita pelo método quatro também foi executada em temperatura ambiente, e sob agitação magnética constante. Neste procedimento, 1,0 mL de AgNPs foi adicionado a 10,0 mL de água deionizada, seguido do acréscimo de 2,2 mL de solução aquosa  $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Subsequentemente foi gotejado 1,0 mL de solução aquosa  $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaBH}_4$ . Após o acréscimo desta última, obteve-se uma suspensão coloidal de cor roxa, e esta permaneceu estável por vários dias.

#### *Método cinco (M5)*

Do mesmo modo que descrito pelos dois últimos métodos, a síntese proposta pelo o método cinco foi feita em temperatura ambiente, e sob agitação magnética constante. Neste procedimento 1,0 mL de AgNPs foi adicionado a 10,0 mL de água deionizada, seguido pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de solução aquosa  $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Adicionou-se, então, gota a gota, 1,0 mL de solução aquosa  $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaBH}_4$ . Com a adição do sal redutor obteve-se uma suspensão coloidal de coloração vermelha estável por vários dias.

#### *Método seis (M6)*

Diferentemente do proposto nos cinco métodos anteriores, as NPs nucleadoras de prata utilizadas nesta sínteses são as que possuem núcleo de sílica ( $\text{SiO}_2@Ag$ ). Este coloide foi sintetizado e caracterizado pelo aluno de iniciação científica Bruno Guilherme da Fonseca. Em um erlenmeyer foram adicionados 2,4 mL de NPs  $\text{SiO}_2@Ag$  40,0 mL de solução aquosa  $5,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaBH}_4$ , seguida da adição de 5,0 mL de solução aquosa  $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . A adição do Au (III) foi feita bem lentamente, a uma taxa de gotejamento de 50  $\mu\text{L}$  a cada 5 minutos. Ao final foi adicionado 1,0 mL de solução aquosa  $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de citrato de sódio di-

hidratado. Conforme as adições de Au (III) foram feitas o coloide, inicialmente vermelho, apresentou mudanças gradativas de tons, sendo que a coloração final observada foi azul escuro. O coloide permaneceu estável por várias semanas quando armazenado sob refrigeração.

A Tabela 1 apresenta a concentração final de cada um dos reagentes e a proporção molar entre os mesmos para cada uma das sínteses de AuNPs descritas acima.

**Tabela 1:** Concentração final dos reagentes em mol.L<sup>-1</sup> e proporção molar entre parênteses.

Método	Reagentes			
	HAuCl <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	NPs nucleadoras	NaBH <sub>4</sub>	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
M1	4,3.10 <sup>-4</sup> (1)	8,9.10 <sup>-6</sup> (0,021)	4,6.10 <sup>-6</sup> (11)	8,5.10 <sup>-5</sup> (3,5)
M2	4,3.10 <sup>-4</sup> (1)	8,9.10 <sup>-6</sup> (0,021)	4,6.10 <sup>-6</sup> (11)	-
M3	3,7.10 <sup>-4</sup> (1)	1,34.10 <sup>-5</sup> (0,035)	1,0.10 <sup>-3</sup> (2,7)	-
M4	6,2.10 <sup>-4</sup> (1)	1,2.10 <sup>-5</sup> (0,019)	1,1.10 <sup>-3</sup> (1,78)	-
M5	1,6.10 <sup>-4</sup> (1)	1,4.10 <sup>-5</sup> (0,088)	1,2.10 <sup>-3</sup> (7,5)	-
M6	4,3.10 <sup>-4</sup> (1)	1,9.10 <sup>-4</sup> (0,44)	4,6.10 <sup>-6</sup> (11)	8,5.10 <sup>-5</sup> (3,5)

### **3.2.4 Síntese das nanopartículas de cobre**

As nanopartículas de cobre (CuNPs) foram sintetizadas segundo o método descrito por Coyle *et al* (Coyle, Chumanov e Jagodzinski, 1998), no qual 0,74 mL de solução aquosa 2,0.10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) foi adicionado a 10,0 mL de solução aquosa 2,8.10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> de citrato de sódio di-hidratado. Acrescentou-se, então, lentamente 5,0 mL de solução aquosa 2,0.10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup> de NaBH<sub>4</sub> preparada em solução

aquosa  $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  de hidróxido de sódio. A síntese foi feita sob agitação magnética constante. Neste procedimento, com as primeiras adições da solução de  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{NaOH}$ , a suspensão se tornou marrom, e permaneceu nesta coloração até que todo sal redutor fosse adicionado. Contudo, para evitar agregação do coloide, este foi deixado sob agitação por cerca de 30 minutos após o final da síntese, e neste período o coloide passou para uma coloração azulada, permanecendo estável por semanas.

### **3.3 Cálculos Teóricos**

Os cálculos das frequências vibracionais da rifampicina foram executados em parceria com o aluno de doutorado da UFJF Diego Paschoal, da p-fenilenodiamina com a aluna de iniciação científica da UFJF Ingrid Lopes e das demais moléculas com o professor Gustavo F.S. Andrade, do departamento de Química da UFJF.

Para a simulação dos espectros vibracionais realizada pelo professor Dr. Gustavo Andrade foi utilizado o conjunto de programas Gaussian'09 (Frisch *et al.*, 2009). O método utilizado foi baseado na Teoria de Funcional Densidade (DFT), utilizando o funcional híbrido B3LYP (Lee, Yang e Parr, 1988; Miehlich *et al.*, 1989; Becke, 1993) e o conjunto de funções-base LANL2DZ, que utiliza o conjunto de funções-base duplo-zeta D95V para os elementos do primeiro período (Dunning Jr e Hay, 1977) e o conjunto de pseudo-potenciais Los Alamos ECP+DZ para átomos mais pesados (Hay e Wadt, 1985b; a; Wadt e Hay, 1985). As estruturas foram otimizadas para menor energia e verificou-se que se tratava de mínimos locais pela ausência de frequências imaginárias nos espectros calculados. Foram utilizados modelos de adsorção contendo o átomo do metal de interesse, com variação da carga e spin do átomos metálicos ligados aos adsorbatos estudados. A atividade Raman calculada foi corrigida para intensidade Raman utilizando correções propostas na literatura (Collier, Magdo e Klots, 1999).

Para a simulação dos espectros vibracionais da Rifampicina as geometrias foram otimizadas em fase gasosa no nível DFT com o funcional B3LYP (Lee, Yang e Parr, 1988; Becke, 1993; Stephens *et al.*, 1994) e com o conjunto de funções de base 6-31G(d) (Hariharan e Pople, 1973) para todos os átomos exceto para o átomo de ouro, que foi tratado com o potencial efetivo LanL2DZ que apresenta 60 elétrons de caroço e 29 elétrons de valência, estes descritos pela base de valência [3s3p2d](Hay e Wadt, 1985b). Os espectros Raman foram calculados no mesmo nível de teoria e as

frequências e atividades foram usadas como entrada para ajustar a função Lorentziana (Santos *et al.*, 1999) de forma a se representar as bandas do espectro. As principais bandas foram atribuídas por meio de análise visual dos modos normais. Todos os cálculos foram realizados usando o programa Gaussian'09 (Frisch *et al.*, 2009).

Para a simulação dos espectros vibracionais da p-fenilenodiamina foi utilizado o conjunto de programas Gaussian'09 (Frisch *et al.*, 2009). O método utilizado foi baseado na DFT, utilizando o funcional PBE1PBE. O átomo de ouro foi tratado com potencial efetivo LanL2DZ, enquanto que os demais átomos não metálicos utilizou-se o conjunto de funções de base 6-31+G(d) (Hariharan e Pople, 1973). As estruturas foram otimizadas para menor energia e verificou-se que se tratava de mínimos locais pela ausência de frequências imaginárias nos espectros calculados.

## **4- RESULTADOS E DISCUSSÕES**

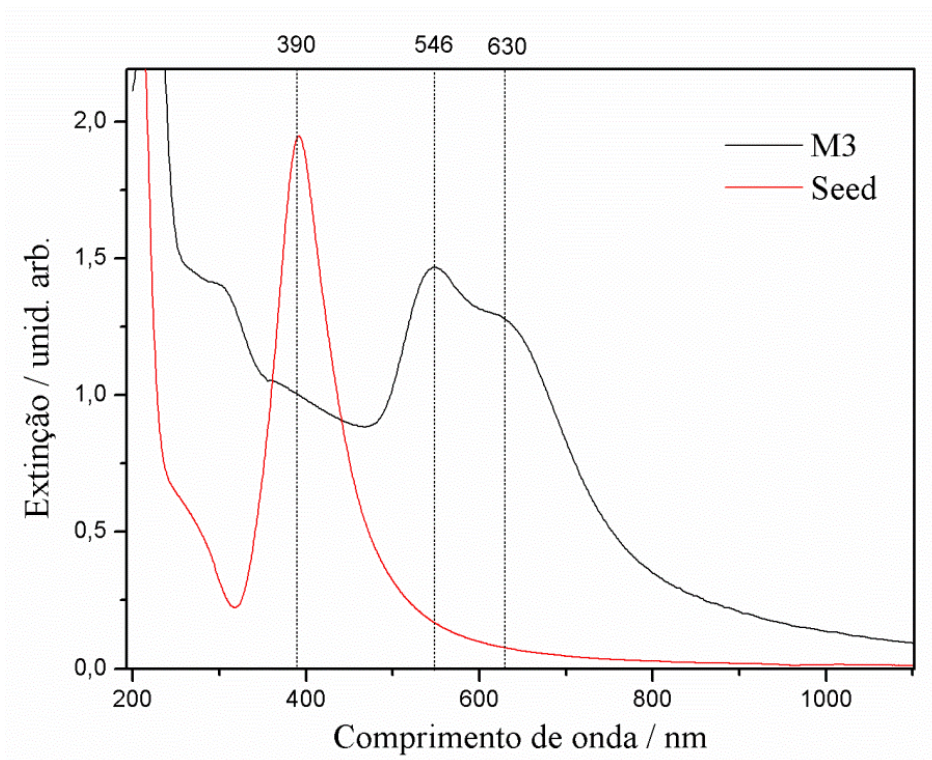
### **4.1 Caracterização das nanopartículas**

#### **4.1.1 Nanopartículas de ouro**

Coloides de Au (AuNPs) podem ser preparados seguindo diferentes metodologias (Sardar *et al.*, 2009) para que apresentem atividade SERS apreciável. Suas propriedades físico-químicas são dependentes da forma e do tamanho das NPs. Procedimentos como a limpeza adequada da vidraria a ser empregada e a pureza dos reagentes é fundamental para evitar a agregação das NPs obtidas no processo. A síntese das AuNPs estabilizadas com citrato de sódio, baseadas na redução do ácido cloroáurico, pelo próprio citrato ou pelo boroidreto de sódio, são as mais comumente utilizadas para procedimentos em meio aquoso (De Faria, Temperini e Sala, 1999). Seguindo este método, é possível controlar o tamanho e a forma das AuNPs pela simples variação das condições de reação – por exemplo, a razão molar entre os reagentes, pH e solvente (Bastus, Comenge e Puentes, 2011).

Nos espectros de extinção, os coloides de ouro normalmente apresentam bandas LSPR na região do visível, em torno de 520 nm para partículas quase esféricas (Turkevich, Stevenson e Hillier, 1951), embora esta banda possa ser deslocada para o infravermelho próximo dependendo da geometria das NPs. Devido a esta dependência, a deposição de sucessivas camadas de metal pode mudar completamente a condição de ressonância, e com isso alterar a cor da dispersão de NPs. Por exemplo, NPs nucleadoras de prata, originalmente amarelas, apresentam coloração vermelha ou cinza após a deposição de ouro. Esta mudança de cor está correlacionada com a formação de uma camada de ouro sobre elas e ao aumento do tamanho das NPs, verificada pelo deslocamento do máximo da banda LSPR correspondente no espectro de extinção, como apresentado na Figura 6.

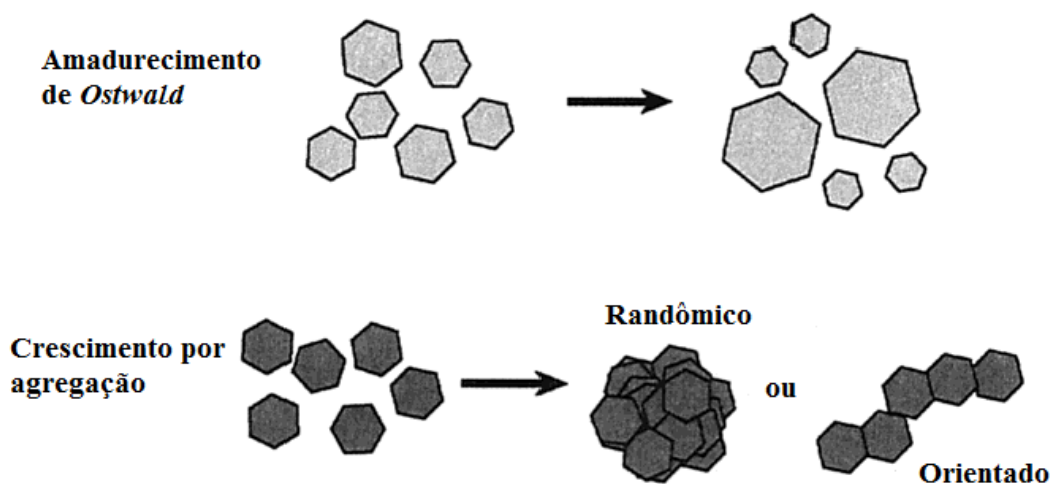




**Figura 6:** Espectros de extinção das NPs nucleadoras de prata e do coloide sintetizado segundo M3.

Nesta figura observam-se os espectros de extinção das NPs nucleadoras de prata e de um dos coloides sintetizados. A banda LSPR para as AgNPs nucleadoras é relativamente estreita, indicando que a distribuição de tamanhos é bastante homogênea. O máximo de extinção, localizado em 390 nm, está de acordo com o esperado para pequenas NPs de prata, que segundo a literatura é encontrado entre 385 e 400 nm, para diâmetro médio entre 10 e 20 nm (Sutherland e Winefordner, 1992). Após a deposição da camada de ouro, feita segundo M3, observa-se o deslocamento do máximo de extinção para 546 nm, e observa-se um ombro em 630 nm, além de alargamento significativo da banda LSPR. As NPs nucleadoras de prata foram totalmente recobertas pela camada de ouro, já que no espectro apresentado na Figura 6, não se observa banda na região de 390 nm para o coloide sintetizado segundo M3. O considerável deslocamento no espectro de extinção era esperado, devido ao crescimento das NPs e também pelo recobrimento das AgNPs pelo ouro, visualmente observado pela mudança de cor observada no coloide. As NPs nucleadoras de prata apresentavam coloração amarela intensa e após a formação da camada de ouro, através da redução do sal deste metal, o coloide torna-se vermelho escuro.

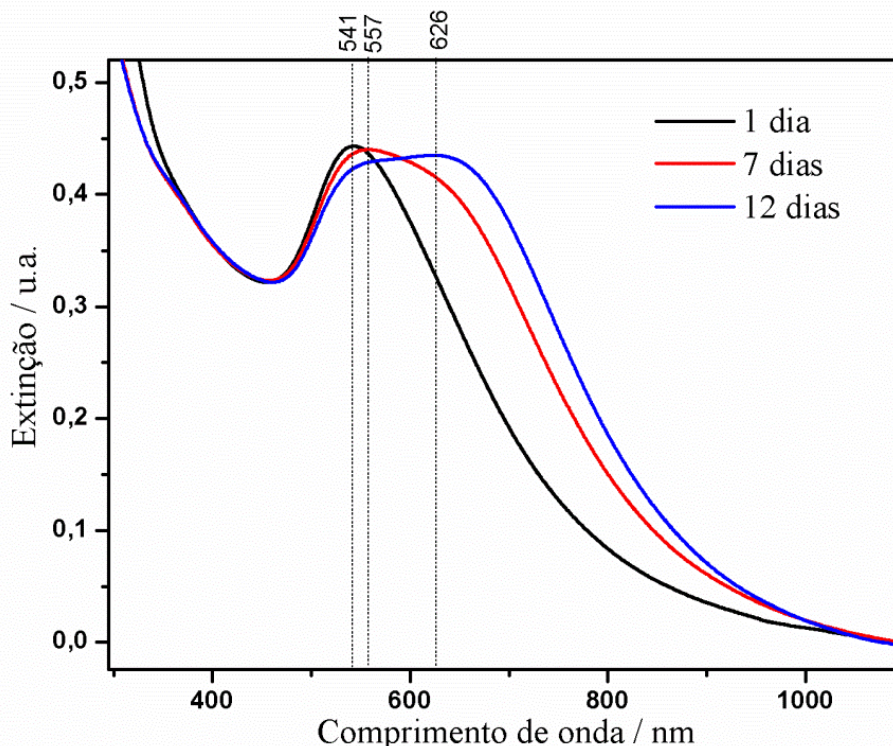
Em geral, quando NPs são sintetizadas em solução, a etapa inicial de nucleação é bastante rápida, e o crescimento subsequente ocorre por três mecanismos: amadurecimento de *Ostwald* (*Ostwald Ripening*) ou crescimento envolvendo agregação (Penn *et al.*, 2001), ou ainda redução catalisada na superfície das NPs nucleadoras (Zhang, Okuni e Toshima, 2011). O primeiro processo envolve crescimento de cristais maiores pela aglomeração dos cristais menores e reconstrução. Devido ao potencial químico da partícula aumentar com a diminuição do tamanho, as partículas menores tendem a formar partículas de maior tamanho, resultando em partículas facetadas (Penn *et al.*, 2001). O segundo mecanismo de crescimento, por agregação, produz conjuntos construídos a partir de NPs randomicamente orientadas ou seguindo um padrão de orientação. Estes agregados podem ser desfeitos com uso de adsorbatos, que levem à modificação química da superfície, ou simplesmente por sonicação. A Figura 6 ilustra estes dois processos de crescimento.



**Figura 7:** Representação esquemática dos dois mecanismos de crescimento de NPs, adaptado (Penn *et al.*, 2001).

A estabilidade de suspensões coloidais é governada pelo balanço entre as forças atrativas de Van der Waals e a repulsão coulombiana entre as partículas carregadas (Satoh *et al.*, 1994). No processo descrito pelo amadurecimento de *Ostwald* as NPs menores perdem identidade quando formam NPs de maiores tamanhos, evidenciando o processo de reconstrução. No mecanismo de crescimento por agregação ainda é possível perceber as NPs de tamanhos menores, unidas por forças atrativas mais fracas, e este

processo recebe o nome de agregação. Os dois processos ilustrados na Figura 7 podem ocorrer concomitantemente, e para investigar qual deles era predominante no processo de envelhecimento do coloide M1, a cinética de envelhecimento ao longo do tempo foi realizada através dos espectros LSPR deste coloide. Realizaram-se ainda medidas de espalhamento dinâmico de luz, e imagens de microscopia eletrônica de varredura, visando compreender o mecanismo de crescimento predominante, Figura 8.

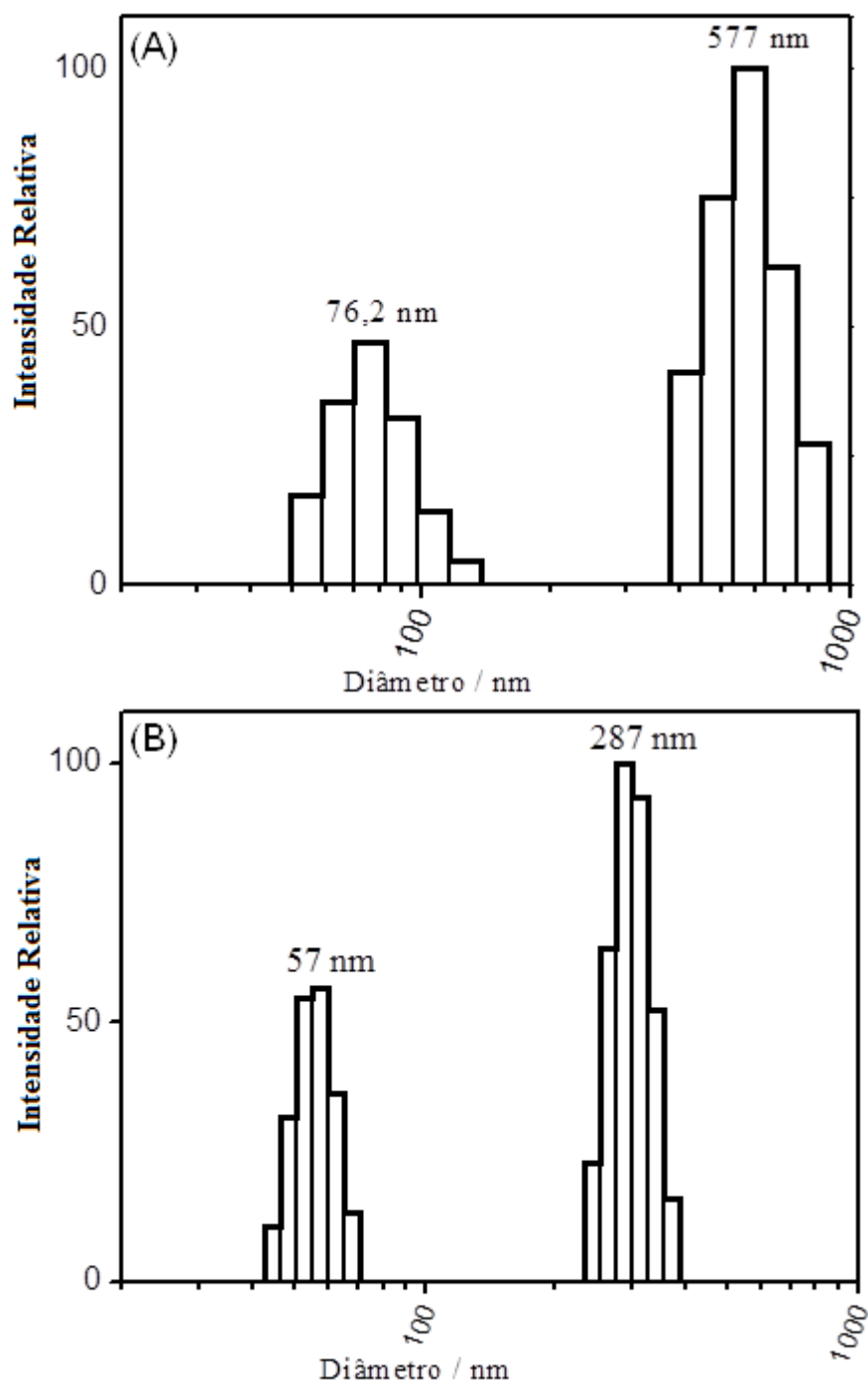


**Figura 8:** Espectros de extinção do coloide M1 armazenado sob refrigeração.

Na Figura 8 pode-se constatar que um dia após ser sintetizado o coloide M1 apresentou um máximo no espectro de extinção localizado em 541 nm. Após sete dias de armazenamento sob refrigeração esse máximo de extinção foi ligeiramente deslocado para 557 nm, sendo que após doze dias de armazenamento o deslocamento foi ainda maior, passando o máximo para 626 nm. Como já comentado anteriormente, o deslocamento do máximo do espectro de extinção na direção do infravermelho evidencia a formação de NPs de tamanhos maiores. Foi observado alargamento considerável da banda LSPR com o envelhecimento do coloide justificado pelo aumento na distribuição de tamanhos das NPs. A diminuição da intensidade da banda na região de 550 nm, e o relativo aumento na região de 630 nm sugerem que ocorreu diminuição

do número de NPs precursoras, formadas na etapa de nucleação, e consequente aumento das NPs de maior tamanho.

Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – *Dynamic light scattering*) é uma das técnicas mais versáteis e úteis para se realizar medidas *in situ* visando observar a distribuição de tamanho das NPs na suspensão coloidal (Pecora, 2000). Essa técnica se baseia na flutuação da intensidade de luz espalhada pela dispersão, fenômeno decorrente do movimento browniano de suas partículas (Pecora, 2000). O diâmetro hidrodinâmico médio corresponde ao diâmetro da partícula mais a espessura da dupla camada elétrica (Rozenfeld, 2011). A Figura 9 mostra as distribuições de tamanhos para o coloide M1, obtidas por medidas de DLS, antes e após a submissão do coloide a 30 minutos de sonicação.

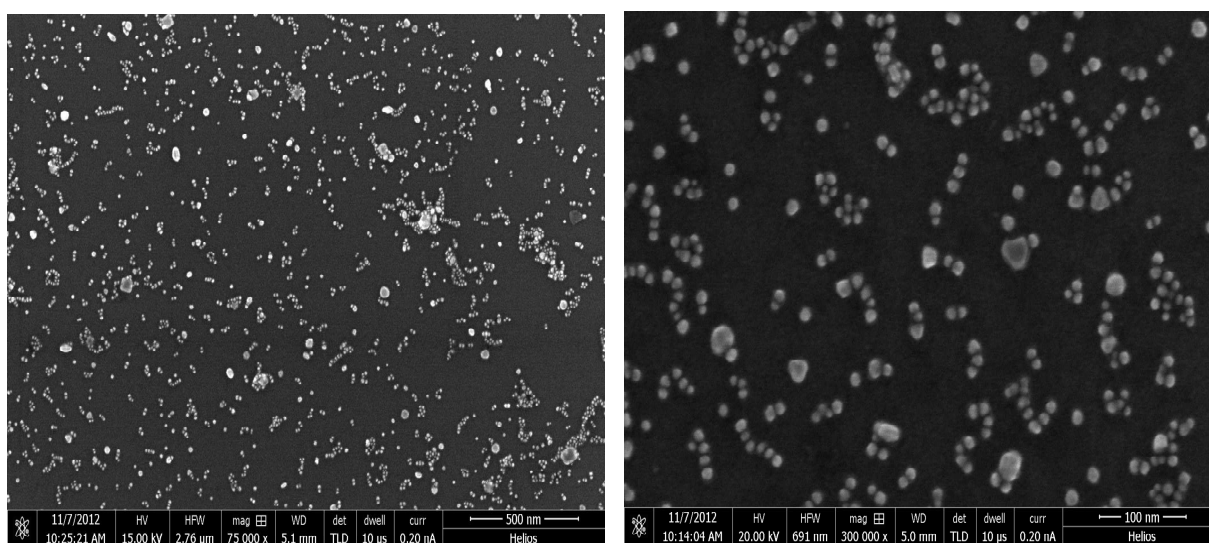


**Figura 9:** Distribuição de tamanhos do coloide M1 sem exposição ao ultrassom (A); e após 30 minutos no ultrassom (B).

Observa-se na Figura 9A que houve a formação de partículas com dois tamanhos médios diferentes, 76,2 nm e 577 nm. Algumas estruturas com maior tamanho se mantiveram unidas por interações eletrostáticas fracas, não havendo acoplamento definitivo entre elas. Por esse motivo, após a aplicação ao ultrassom os agregados foram parcialmente desfeitos, observando predominância de agregados de menor tamanho, e

também de NPs isoladas, Figura 9B. Através dessas medidas, pode-se concluir que as NPs são formadas pelos diferentes métodos de crescimento, amadurecimento de *Ostwald* e agregação.

As medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) também fornecem importantes informações sobre a forma e o tamanho das NPs. No entanto, para a obtenção da imagem é necessária preparação prévia da amostra. Para a obtenção das imagens MEV apresentadas neste trabalho, o coloide foi seco no vácuo sobre placa de silício. A Figura 10 apresenta as imagens de MEV para o coloide M1.

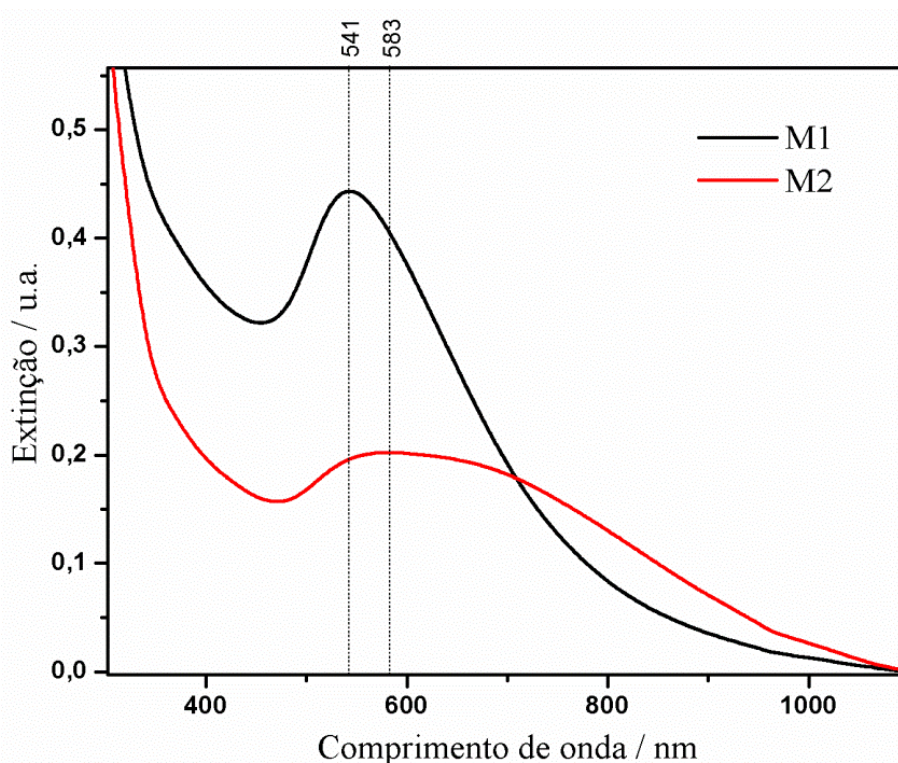


**Figura 10:** Imagens MEV das AuNPs sintetizadas segundo M1 com diferentes magnificações.

As imagens MEV confirmam a proposta de formação de aglomerados de tamanhos maiores à custa das NPs menores, sem perda de identidade, já que é possível distinguir as NPs precursoras. Pode-se observar NPs isoladas com diâmetro entre 30 e 40 nm, formadas por NPs precursoras com tamanho entre 10 e 15 nm. Além de aglomerados maiores, o que condiz com o máximo de extinção do plasmon de superfície localizado (620 nm) e com a larga distribuição de tamanhos.

Entre os muitos trabalhos descritos na literatura sobre o uso do citrato de sódio na preparação de coloides, há concordância a respeito do duplo papel desempenhado por este reagente: atuando como agente redutor e grupo protetor (Ji *et al.*, 2007). Em virtude disso, testou-se a estabilidade do coloide sintetizado segundo M1 sem que o

citrato de sódio fosse adicionado ao fim da síntese, recebendo o coloide a denominação M2. Os espectros LSPR dos dois coloides estão apresentados na Figura 11.

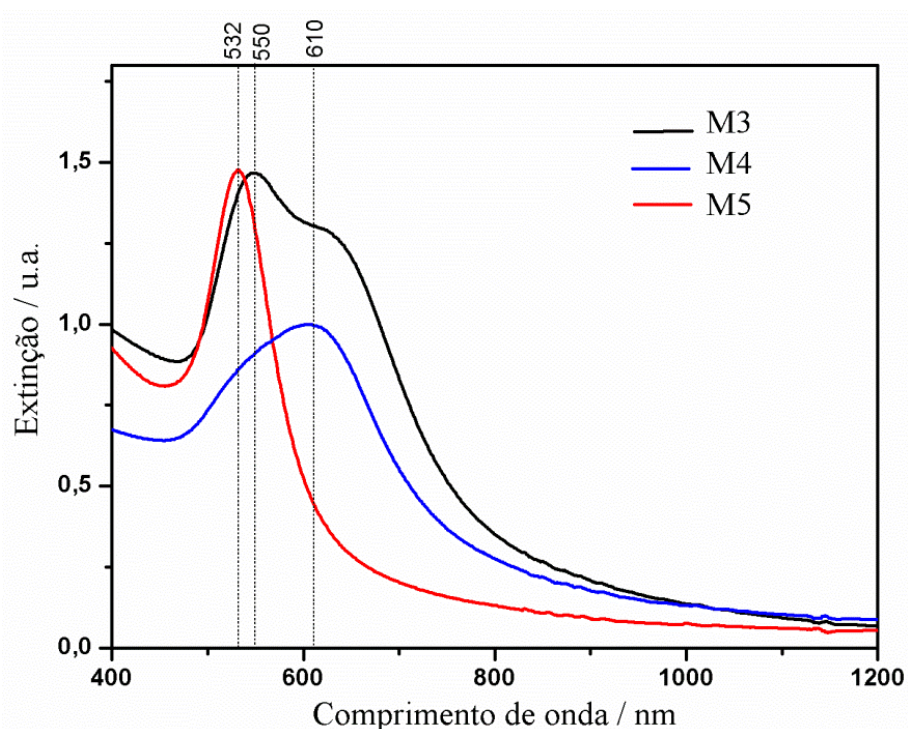


**Figura 11:** Espectros de extinção do coloide M1 e M2.

Através do espectro de extinção, apresentado na Figura 11, pode-se observar que com a adição do citrato de sódio há intensificação da banda na região do visível, e consequente diminuição na região do infravermelho próximo, indicando que há favorecimento para a desagregação das NPs. Isto se deve ao recobrimento das mesmas pelo citrato de sódio, que por repulsão das cargas elétricas destes ânions adsorvidos nas superfícies das NPs dificulta a formação de agregados de tamanhos maiores. O coloide M1 permaneceu estável por semanas, enquanto o coloide M2 sofreu agregação dentro de alguns dias, corroborando a hipótese de estabilidade adicional fornecida pelo citrato de sódio.

Ainda no âmbito de investigação e síntese das NPs de ouro, foram sintetizados três coloides variando-se a concentração de sal de ouro e de boroidreto de sódio adicionados durante a síntese, os coloides sintetizados segundo métodos M3, M4 e M5. Nestes coloides não houve adição de citrato de sódio ao final da síntese, e mesmo assim eles permaneceram estáveis por semanas. Isto se deveu às distintas proporções entre os

reagentes, que foram significativamente diferente dos coloides obtidos em M1 e M2. A Figura 12 apresenta os espectros LSPR desses três coloides.



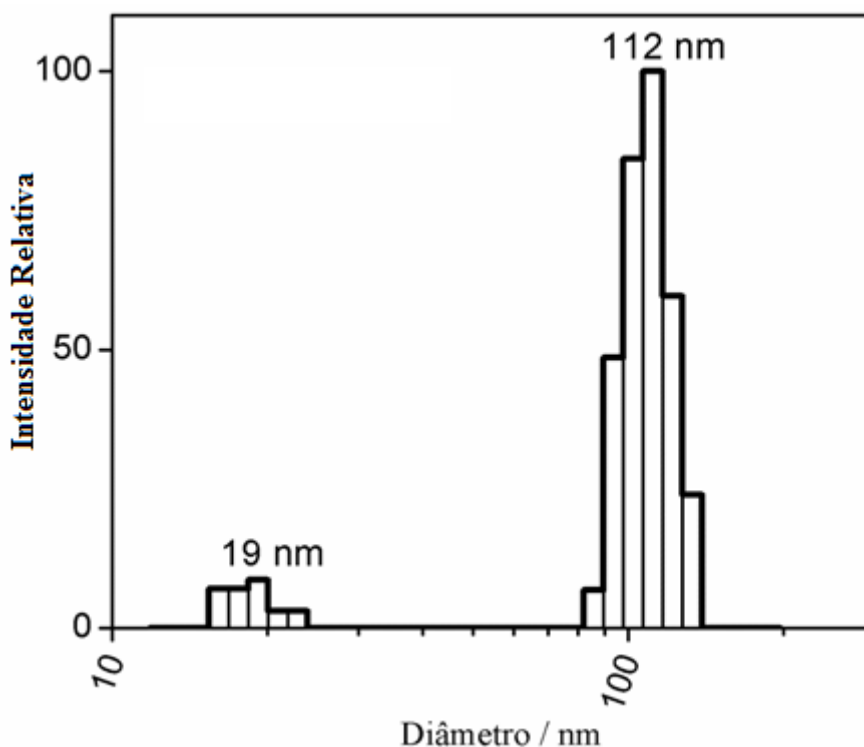
**Figura 12:** Espectros de extinção dos coloides obtidos nos procedimentos M3, M4 e M5.

O coloide M5 possui a menor concentração de ouro em comparação aos outros dois coloides e a distribuição de tamanhos nesse coloide é relativamente pequena, já que a banda LSPR não é muito larga. O máximo de extinção localizado em menor comprimento de onda (532 nm) evidencia a formação de partículas com tamanhos menores do que os coloides M3 e M4. O coloide M4, procedimento no qual foi adicionada maior quantidade de sal de ouro, apresenta banda LSPR com largura apreciável, indicando que a distribuição de tamanhos não é homogênea. Em comparação com o coloide M5, observa-se a presença de NPs maiores, uma vez que o máximo de extinção se encontra em maior comprimento de onda (610 nm). No coloide M3, com concentração intermediária de sal de ouro, observa-se a formação tanto de partículas maiores quanto de partículas menores, devido à sobreposição de bandas apresentada no espectro deste coloide. O máximo centrado em 550 nm evidencia que as NPs de menor tamanho são majoritárias, sem que se exclua, no entanto, a presença de NPs maiores, evidenciada pelo ombro próximo a 625 nm.

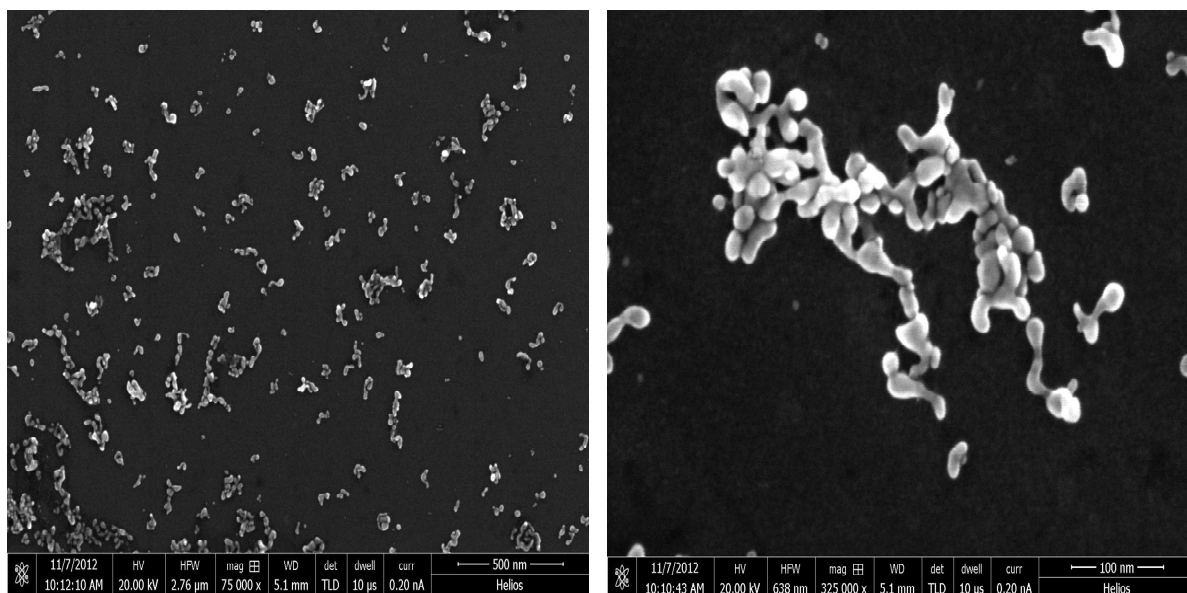


A posição precisa e forma das bandas LSPR são muito sensíveis à distribuição de tamanhos e à forma das NPs e essas podem ser as razões para as diferenças observadas nos espectros experimentais. Pôde-se concluir, portanto, que a concentração do sal de ouro influencia de modo significativo a posição e a largura da banda no espectro de extinção do coloide. A maior quantidade de sal de ouro levou a formação de NPs maiores, uma vez que a espessura da camada deste metal formada sobre as NPs nucleadoras de prata foi maior. Destes três coloides escolheu-se o de concentração intermediária de ouro (M3) para caracterização adicional, e também obtenção dos espectros SERS.

A caracterização do coloide M3 foi feita através de medidas de DLS e MEV, os resultados estão apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente. Com a medida de DLS obteve-se a distribuição de tamanhos para as NPs deste coloide. Pode-se observar predominância de NPs com tamanho aproximado de 112 nm. Há também a presença de NPs bem menores, em torno de 20 nm, evidenciando a tendência de formação de agregados maiores às custas de NPs de menor tamanho. Os dados obtidos pela medida de DLS são confirmados pela imagem MEV.

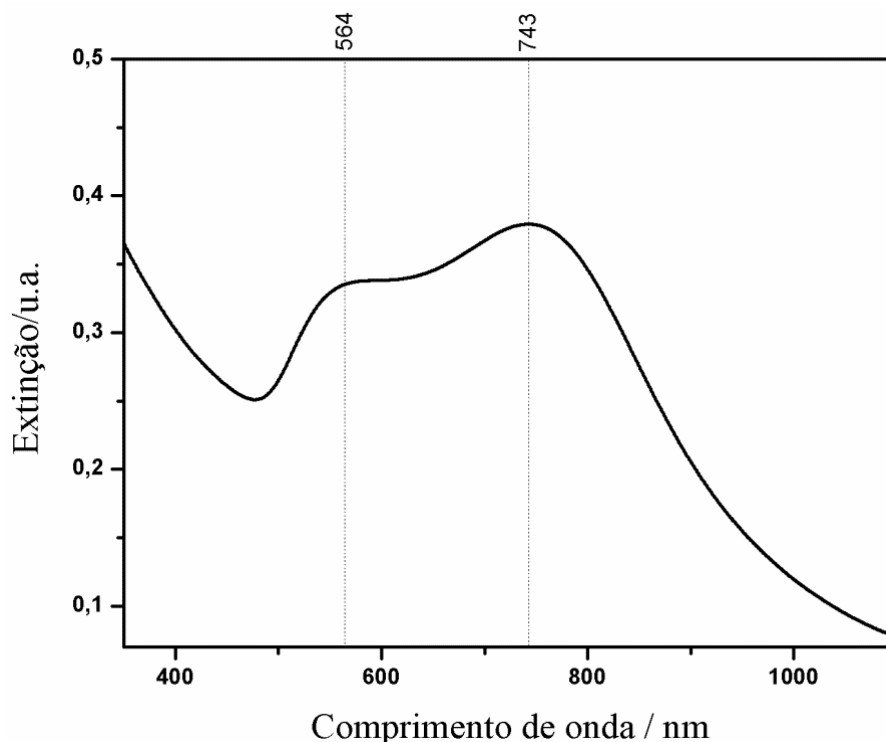


**Figura 13:** Distribuição de tamanhos do coloide M3.



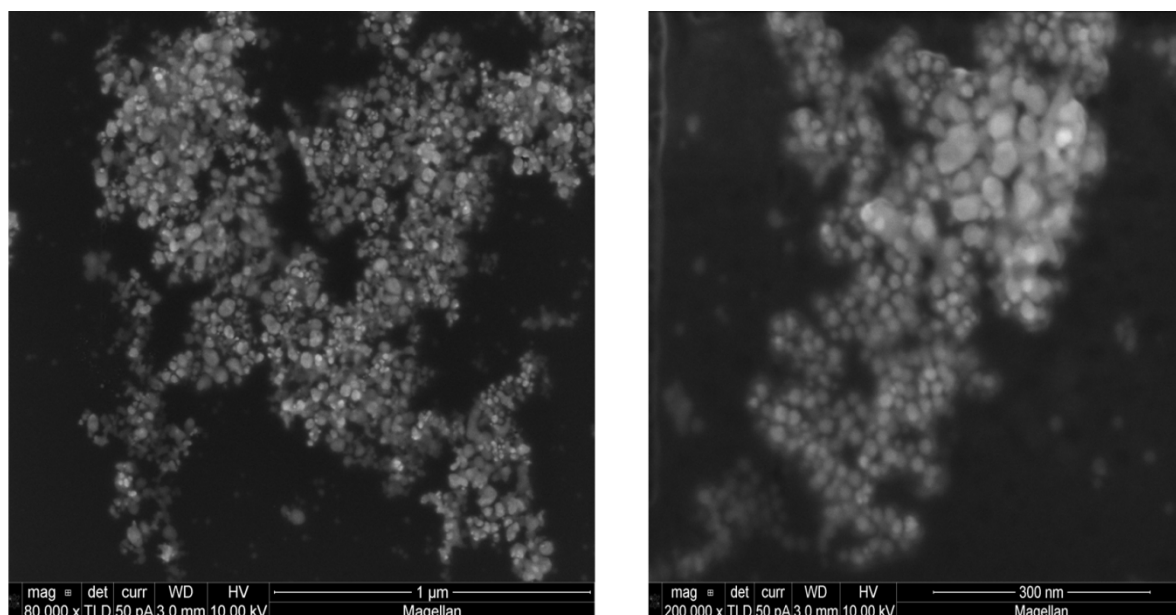
**Figura 14:** Imagens de MEV do coloide M3 com diferentes magnificações.

Em todas as sínteses de coloides apresentadas até o momento neste trabalho, utilizou-se NPs nucleadoras de prata como sítio de nucleação para crescimento do ouro reduzido. Visando investigar as diferenças observadas quando as NPs nucleadoras são feitas de outro modo, sintetizou-se o coloide M6, no qual foram utilizadas NPs com núcleo de sílica recobertos com AgNPs como sítios de nucleação. Após a redução do sal de ouro sobre estas NPs, obteve-se o espectro LSPR para o coloide M6, o qual é apresentado na Figura 15. Pode-se observar grande distribuição de tamanhos, devido à banda LSPR de largura apreciável (400 nm). A presença de um ombro localizado em 564 nm e o máximo da banda em 743 nm mostra que as NPs de maior tamanho são predominantes, embora ainda haja NPs menores.



**Figura 15:** Espectro de extinção do coloide M6.

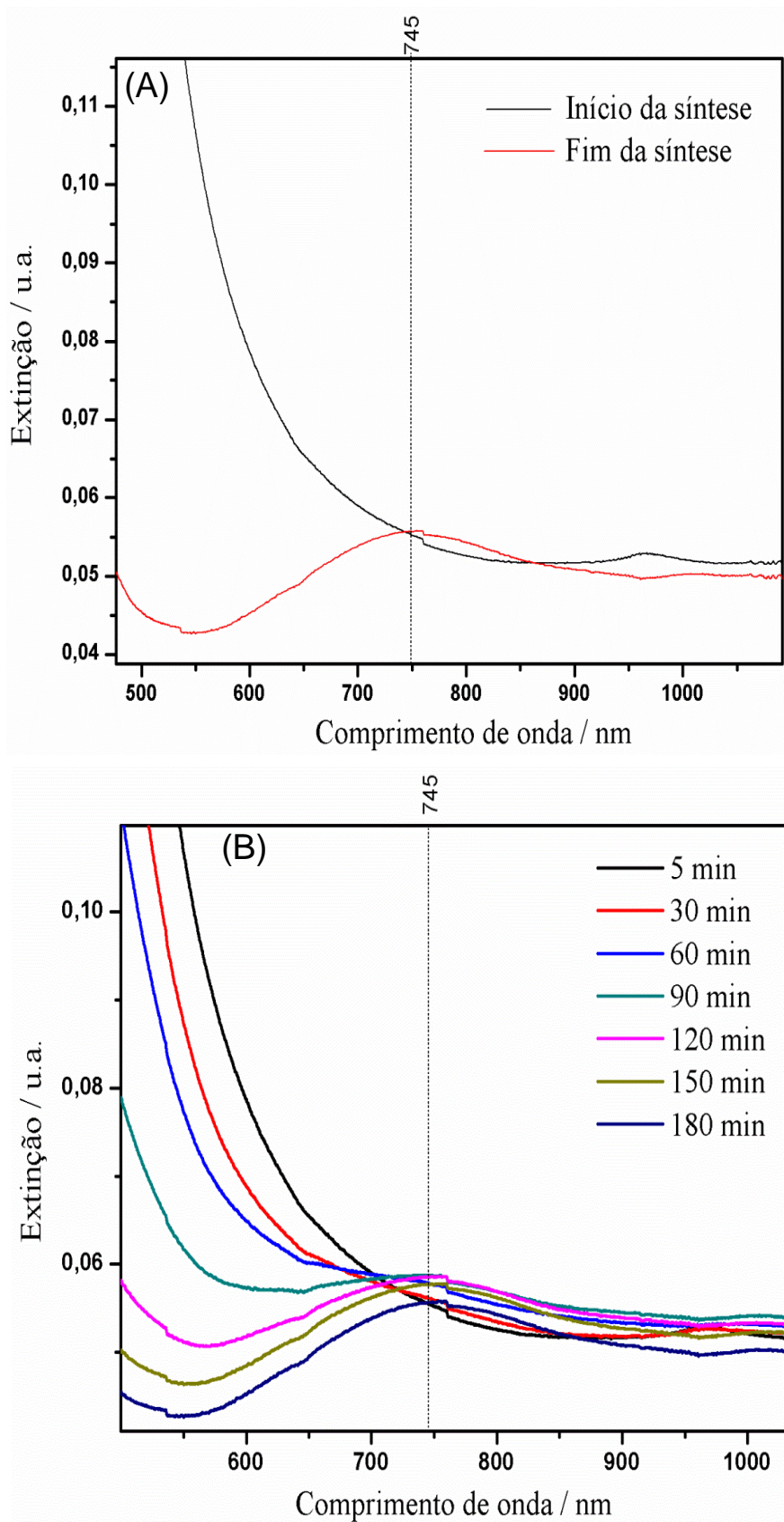
O coloide M1 e o coloide M6 foram sintetizados de modo bastante semelhante, sendo que a principal diferença são as NPs nucleadoras. Nos espectros de extinção de ambos os sistemas são observadas diferenças apreciáveis, tanto na largura da banda LSPR, como na posição do máximo. Comparando a posição do máximo de extinção do coloide M1 e M6, mesmo após o envelhecimento, observamos que no segundo há formação de NPs de tamanhos maiores. Considerando que a concentração de ouro nos dois coloides é a mesma, e que as NPs nucleadoras de prata possuem aproximadamente o mesmo tamanho, pode-se concluir que as NPs de sílica recobertas com as NPs nucleadoras de prata formam AuNPs de tamanhos maiores. Na Figura 16 são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de varredura para o coloide M6, nelas pode-se observar o tamanho médio das NPs para este coloide de aproximadamente 50 nm.



**Figura 16:** Imagens MEV para o coloide M6.

#### **4.1.2 Nanopartículas de cobre**

Coloides de cobre, apesar de apresentarem bom sinal SERS, recebem menos atenção na literatura do que os demais metais nobres, como ouro e prata, devido à baixa estabilidade do Cu(0) em meio aquoso quando exposto ao ar. Durante a síntese das CuNPs, com as primeiras adições de NaBH<sub>4</sub> a mistura se tornou marrom, e permaneceu assim até o final da adição do sal redutor. Após a adição de todo o redutor a mistura foi deixada sobre agitação por aproximadamente meia hora, para evitar a agregação do coloide. Durante esse período, a suspensão se tornou azulada, indicativo da formação de óxido de cobre na superfície da NP. A fina camada de óxido formada protege o núcleo formado de Cu(0) (Rice *et al.*, 2011). A Figura 17 apresenta os espectros de extinção do coloide de cobre após o final da síntese, e ao longo da mesma.



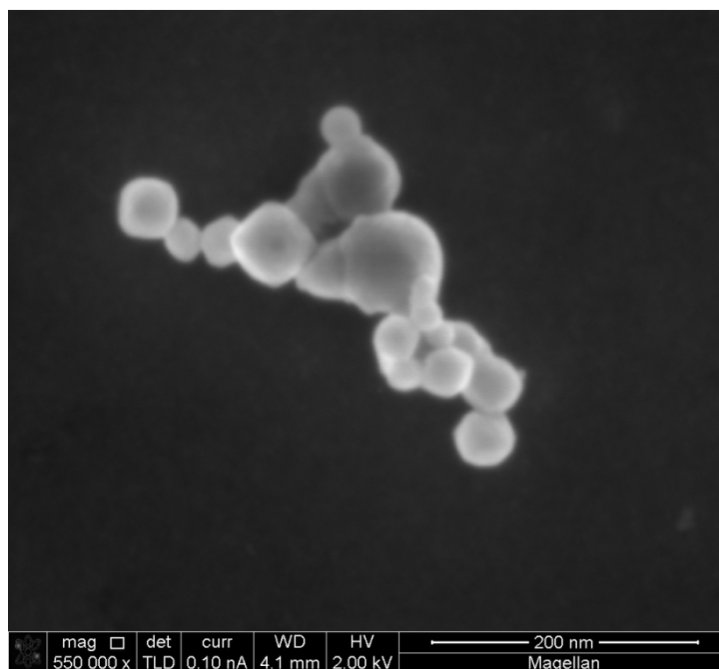
**Figura 17:** Espectros de extinção do coloide de cobre no início e no final da síntese (A); espectros de extinção do coloide ao longo da síntese (B).

Coloides de cobre, com o metal não oxidado, apresentam banda LSPR em aproximadamente 570 nm (Rice *et al.*, 2011). Na Figura 17A pode-se observar que a banda LSPR no início da síntese possui maior intensidade relativa em torno de 500 nm, enquanto que ao fim da síntese tem-se uma banda com maior intensidade centrada em 745 nm, a qual corresponde ao óxido de cobre (II). A Figura 17B traz os espectros de extinção obtidos ao longo da síntese, o primeiro espectro foi obtido 5 minutos após a adição de todo o sal redutor, os demais foram obtidos segundo o tempo descrito na legenda. No decorrer da síntese pode-se observar claramente a formação da banda em 745 nm, ou seja, inicialmente tem-se CuNPs em solução, e ao longo do tempo a superfície de cobre é oxidada, e há a formação de um sistema caroço-casca Cu@CuO, como apresentado na Figura 18. Quando um adsorbato com capacidade redutora é adicionado ao coloide o máximo da banda LSPR é deslocado para menores comprimentos de onda, como foi observado após a adição da p-fenilenodiamina, com a redução da camada de óxido.



**Figura 18:** Formação das NPs de Cu@CuO (Rice *et al.*, 2011).

Foram obtidas imagens MEV para as CuNPs, e estas estão apresentadas na Figura 19.



**Figura 19:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura das CuNPs sintetizadas.

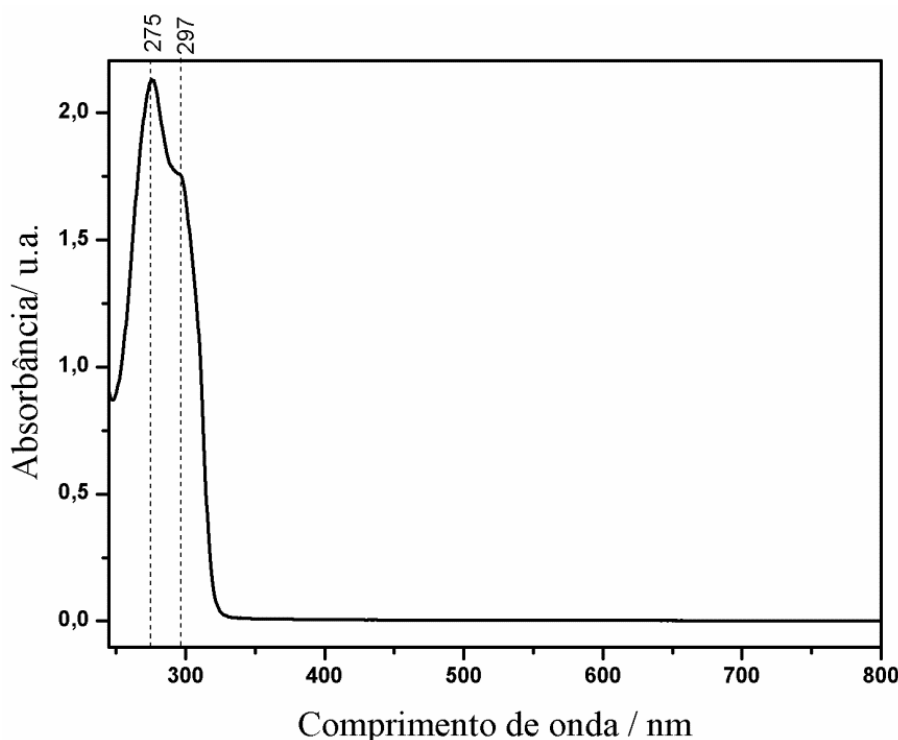
Como se pode observar este aglomerado de CuNPs apresenta dimensão de centenas de nanômetros, sendo formado por NPs precursoras com diâmetros variando de 20 a 70 nm aproximadamente. Isto está condizente com a larga banda LSPR observada nos espectros de extinção, que se estende praticamente por toda a região do visível.

## **4.2 Estudo dos adsorbatos**

### **4.2.1 Serotonina**

O espectro eletrônico da serotonina sofre variações de acordo com pH da solução, em pH neutro o máximo se encontra na região de 290 nm, sendo que com o aumento da basicidade esse máximo é deslocado para região de maiores comprimentos de onda (Chattopadhyay, Rukmini e Mukherjee, 1996). A serotonina apresenta dois valores de pK, um correspondente a desprotonação do grupo OH ( $pK_1= 4,9$ ), e outro correspondente a desprotonação da amina ( $pK_2= 9,8$ )(Tu, Eisen e Chang, 2010). O ponto isoelétrico para a serotonina apresenta valor de 7,35, ou seja, em  $pH= 7,35$  os valores das cargas da serotonina se anulam.

Há também relação da posição do máximo de absorção com o estado de oxidação da molécula. É conhecido que a serotonina é um agente antioxidante, e que sofre processo de oxidação irreversível (Sarada *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003), sendo que o espectro eletrônico do produto de oxidação da serotonina deve apresentar bandas em 532, 350 e 234 nm (Singh, Wrona e Dryhurst, 1992). O espectro eletrônico da serotonina é apresentado na Figura 20.



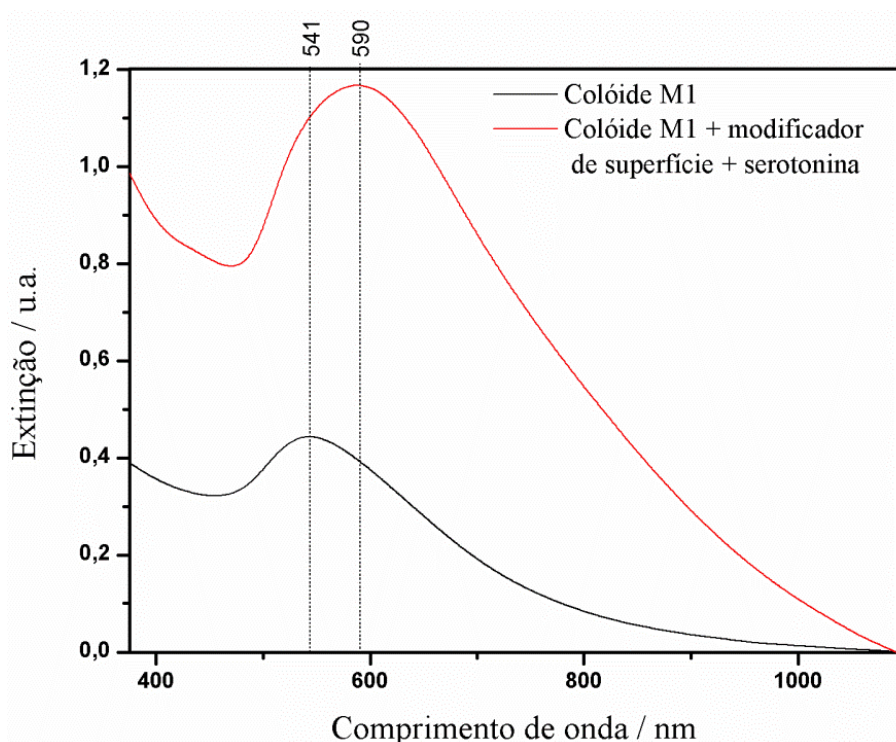
**Figura 20:** espectro eletrônico da solução aquosa de serotonina ( $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>).

De acordo com a posição do máximo de absorbância – em 275 nm com ombro em 297 nm – e o pH da solução, *ca.* 7, a espécie predominante é a não oxidada e totalmente protonada. Mesmo após vários meses de preparo da solução o espectro eletrônico se mantém o mesmo, ou seja, não foi observada oxidação significativa em solução aquosa.

O espectro de extinção das NPs sofre influência do índice de refração do meio externo, portanto, a presença de uma espécie adsorvida pode deslocar a posição do máximo. Também pode ocorrer mudança no formato da banda LSPR, devido a mecanismos de agregação ou desagregação das NPs. Para obtenção dos espectros LSPR e SERS da serotonina utilizou-se um modificador de superfície, o ácido



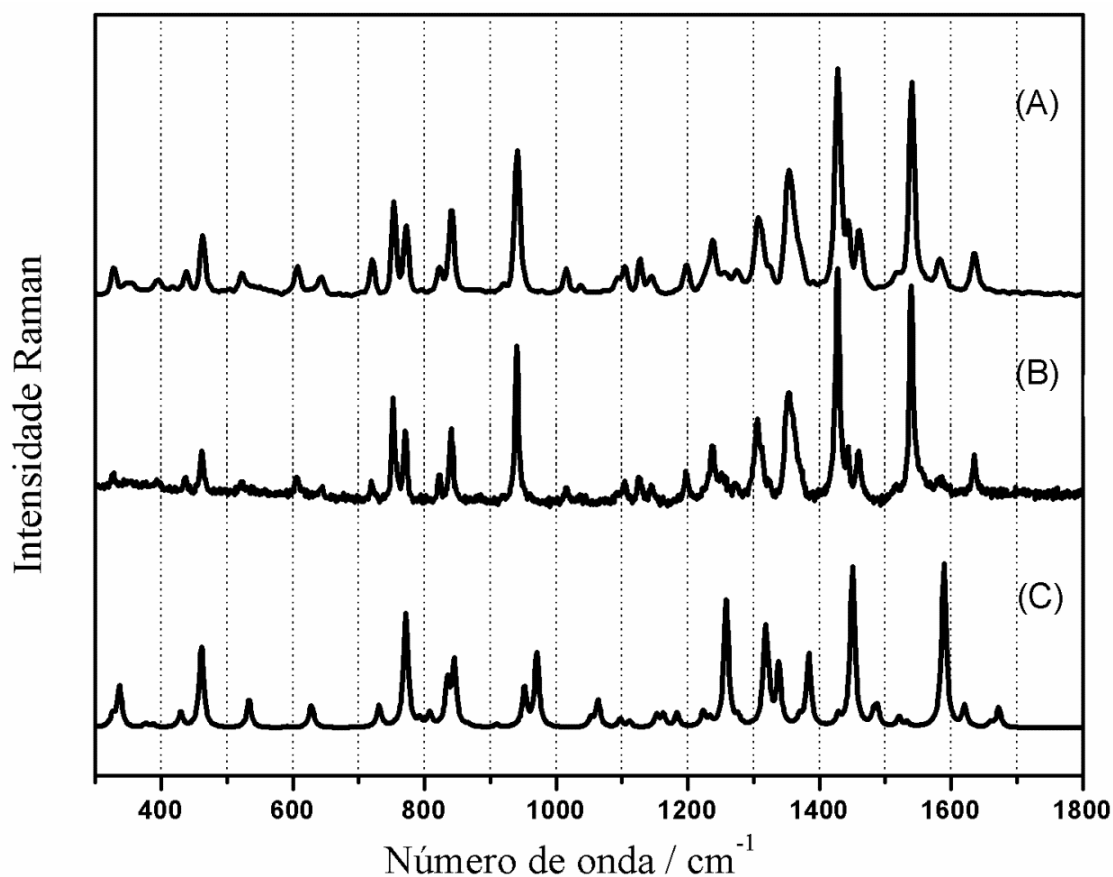
mercaptopropanóico. Os espectros de extinção do colóide M1 na presença de serotonina e do modificador de superfície são apresentados na Figura 21.



**Figura 21:** Espectros de extinção do colóide M1 com adição de serotonina ( $1.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>) e ácido mercaptopropanóico ( $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>).

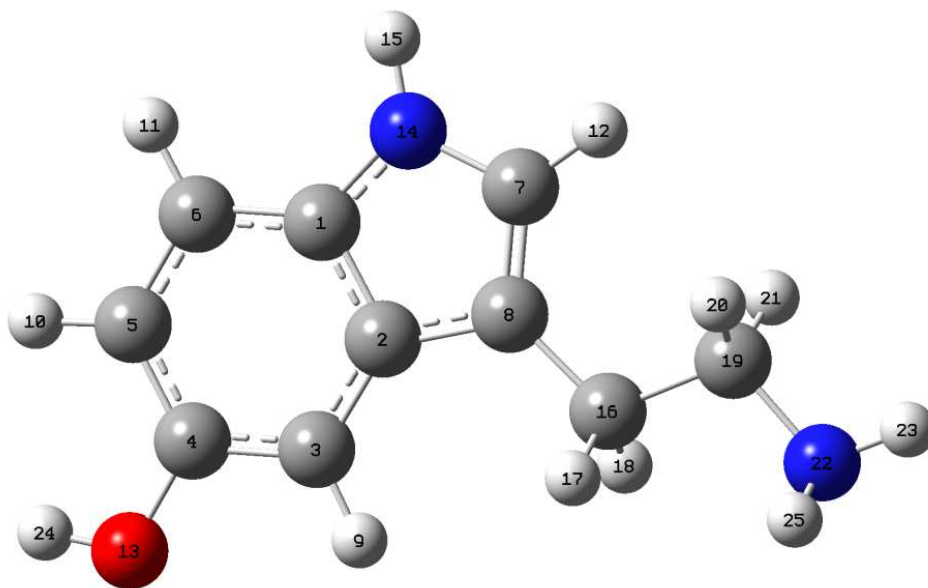
A adição de serotonina e do ácido mercaptopropanóico ao colóide M1 desloca o máximo na direção do infravermelho, passando de 541 nm para 590 nm. Este deslocamento é indicativo da formação de AuNPs de maiores tamanhos, ou seja, a adição do modificador de superfície e da serotonina promove a agregação parcial das NPs. O alargamento da banda indica uma maior distribuição de tamanhos. Há também aumento significativo no valor da absorvidade molar, em função da mudança do índice de refração na superfície da NP pela modificação das espécies adsorvidas.

O espectro Raman normal da serotonina foi obtido com excitação em duas radiações diferentes, 1064 e 632,8 nm (Figura 22) juntamente com o espectro teórico obtido. Como se pode observar existe grande concordância entre os espectros experimentais e o teórico.



**Figura 22:** Espectro Raman da serotonina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A) e 632,8 nm (B); espectro teórico da serotonina (C).

Como pode ser observado nos espectros Raman da Figura 22 e também no espectro eletrônico da serotonina, nenhuma das radiações excitantes estão em ressonância com transições eletrônicas da molécula, ou seja, não há intensificações devidas ao efeito Raman Ressonante. O cálculo do espectro obtido no infravermelho, bem como as atribuições vibracionais, para a serotonina em diferentes níveis de teoria foi recentemente descrito (Bayarı, Saglam e Ustundag, 2005), e os dados obtidos nesta dissertação concordam com os descritos no trabalho citado. A atribuição vibracional para as bandas do espectro Raman desta molécula e a comparação entre os números de onda vibracional e teórico estão descritos na Tabela 2, e a estrutura otimizada para a serotonina está apresentada na Figura 23.



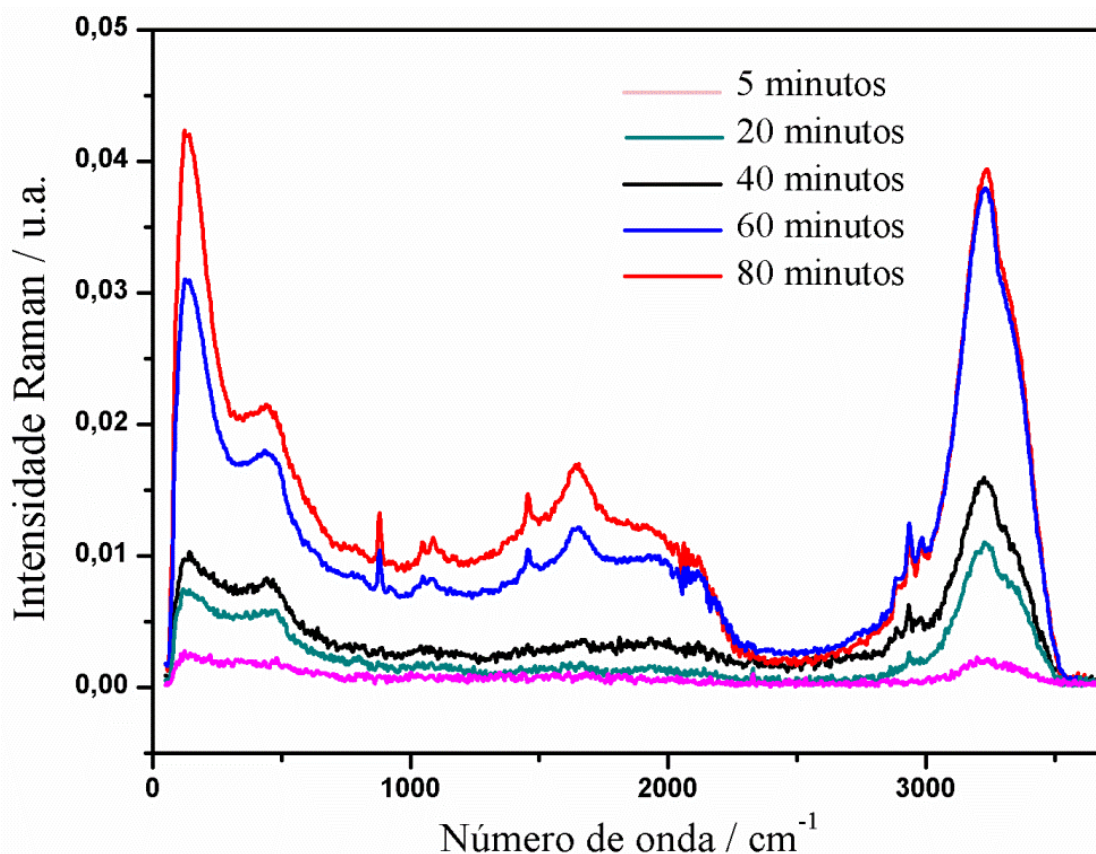
**Figura 23:** Estrutura otimizada para a serotonina.

**Tabela 2:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para as bandas do espectro Raman da serotonina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa	
Experimental		Calculado	
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$	$\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$		
327	327	337	$\delta (\text{C}^{16}\text{C}^{19}\text{N}^{22})$
467	460	461	$\delta (\text{CC})_{\text{an}}$
607	607	630	$\gamma (\text{CC})_{\text{an}}$
752	750	738	$\gamma (\text{CC})_{\text{an}} + \omega (\text{C}^{16}\text{H})$
773	770	771	$\delta (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}}$
840	840	845	$\omega (\text{NH}_2) + \delta (\text{CC})_{\text{an}}$
941	941	971	$\nu (\text{C}^{19}\text{C}^{16}) + \tau (\text{NH}_2)$
1198	1196	1223	$\nu (\text{C}^4\text{O}) + \delta (\text{OH})$
1237	1237	1258	$\tau (\text{CH}_2)$
1308	1305	1318	$\tau (\text{CH}_2) + \delta (\text{CC})_{\text{an}}$
1353	1353	1383	$\tau (\text{CH}_2) + \tau (\text{NH}_2)$
1428	1427	1450	$\nu (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}} + \omega (\text{CH}_2)$
1539	1539	1589	$\nu (\text{CC})_{\text{an}}$
1583	1586	1621	$\nu (\text{CC})_{\text{an}}$
1635	1635	1672	$\nu (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}}$

Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\omega$ : abano (*wagging*);  $\rho$ : pêndulo (*rocking*);  $\tau$ : torção (*twist*); an: anel.

O espectro SERS da serotonina foi obtido com radiação excitante em 1064 nm, utilizando-se o coloide M1 com adição do ácido mercaptopropanóico como modificador de superfície. Os espectros SERS obtidos ao longo do tempo, apresentados na Figura 24, permitem determinar o quanto a ressonância entre o coloide e a radiação incidente são determinantes para observação do efeito SERS.



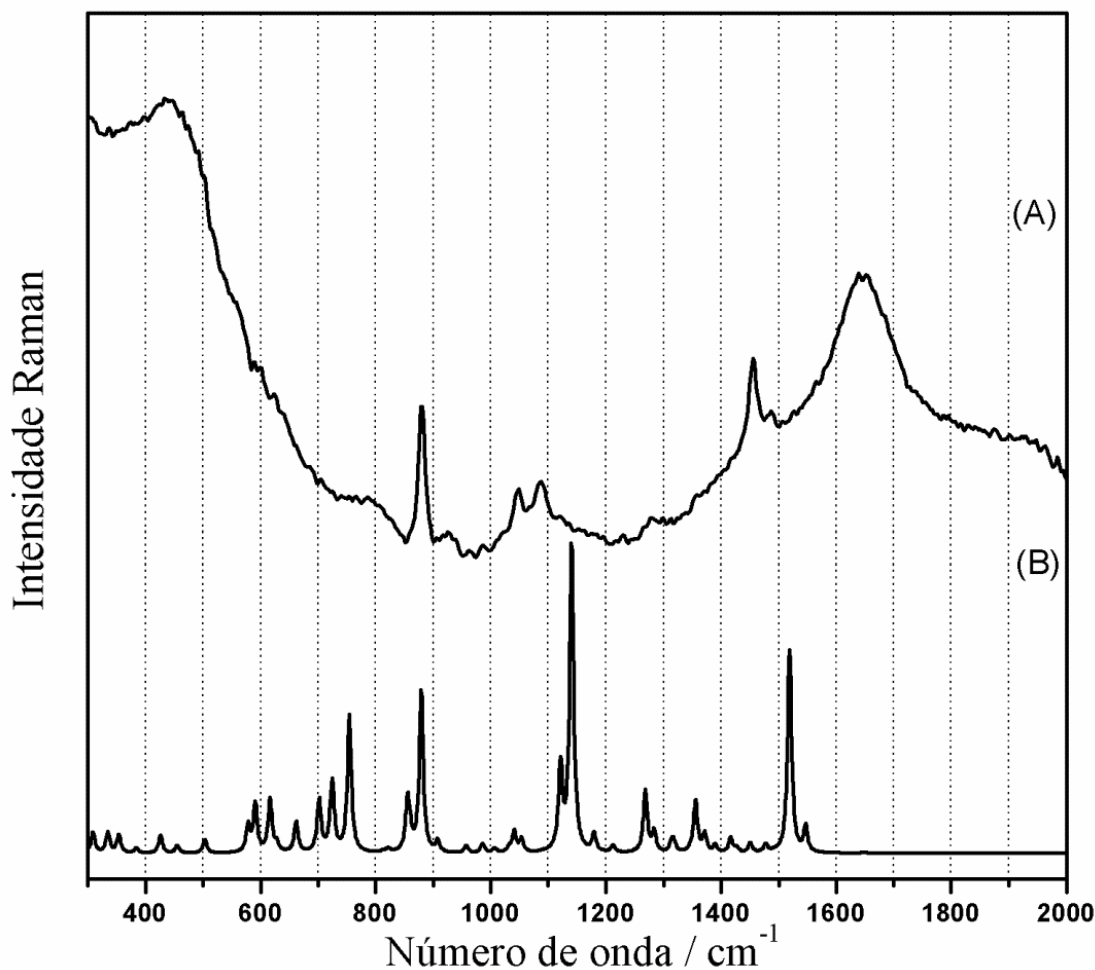
**Figura 24:** Espectros SERS da serotonina ( $2 \cdot 10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ), na presença de ácido mercaptopropanóico ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ), medidos ao longo do tempo.

Estes espectros foram obtidos após a mistura do coloide M1 com o ácido mercaptopropanóico e a serotonina. As primeiras bandas no espectro SERS foram observadas somente após 40 minutos que a mistura foi preparada. A adição do modificador de superfície causou a agregação das NPs do coloide M1, contudo o processo de agregação é lento, e o espectro SERS só foi observado quando o tamanho dos agregados levou à ressonância entre o plasmon de superfície e a radiação excitante utilizada. Após cerca de três horas do preparo da mistura observou-se a formação de agregados visíveis a olho nu, nesta etapa o espectro SERS não foi mais observado. O

tempo ótimo para observação do espectro esteve entre 80 e 100 minutos após a preparação da mistura.

Há que se ressaltar que na medida em que a transição do plasmon de superfície das AuNPs entrou em ressonância com a radiação excitante, ocorreu aumento do fundo de emissão e juntamente foram observadas as bandas referentes aos modos normais das moléculas de água adsorvidas, em 1650, 3200 e 3300  $\text{cm}^{-1}$ .

Diversas configurações foram testadas para a obtenção do espectro teórico da serotonina adsorvida em átomo de ouro, mudando entre elas o sítio de adsorção, o número de átomos de ouro, a multiplicidade e a carga destes átomos. A configuração que mais concordou com o espectro experimental foi aquela em que a serotonina estava adsorvida a um átomo de ouro (III), sendo o sítio de adsorção o nitrogênio do anel indólico. O espectro SERS da serotonina adsorvida em coloide de ouro (M1) na presença do modificador de superfície é apresentado na Figura 25, juntamente com o espectro teórico otimizado.

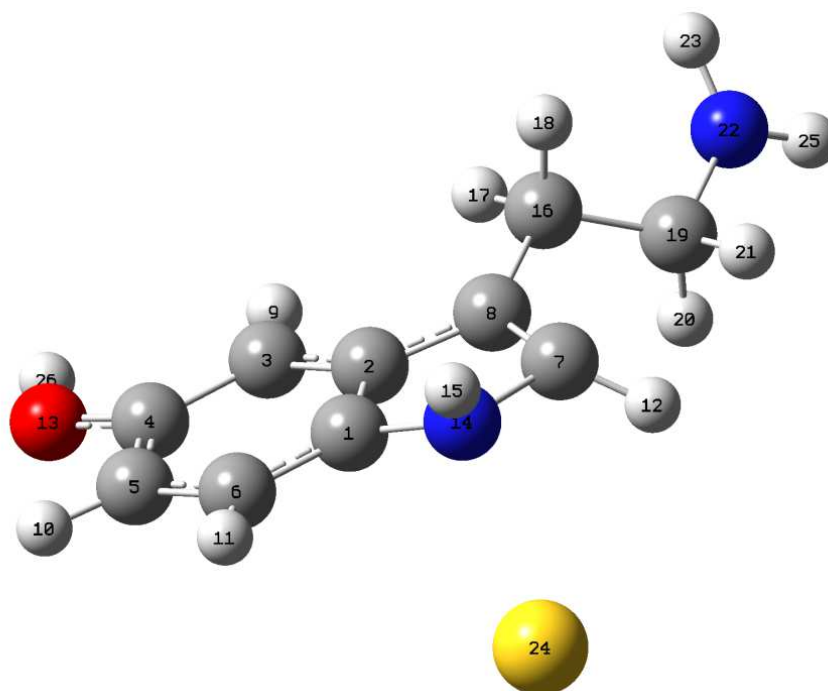


**Figura 25:** Espectro SERS da serotonina ( $2.10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ), na presença de ácido mercaptopropanóico ( $1.10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ) com radiação excitante em 1064 nm (A); espectro teórico da serotonina adsorvida em átomo de ouro (B).

Quando comparados, o espectro teórico e o experimental apresentam diferenças, que podem estar associadas ao fato de que o cálculo dos modos vibracionais não levar em consideração as regras de seleção de superfície, segundo a qual é esperado que os modos vibracionais perpendiculares a superfície metálica sejam mais intensificados (Moskovits, 1982). Como por exemplo a banda em  $755\text{ cm}^{-1}$ , presente no espectro teórico e não resolvida no experimental. Esta banda se refere ao modo de respiração do anel, e segundo a geometria otimizada, o modo é paralelo à superfície de ouro. Outra diferença nos espectros é a banda em  $1650\text{ cm}^{-1}$ , presente no experimental e ausente no calculado. Esta banda se refere à deformação angular da água (Sprik, Hutter e Parrinello, 1996), e por isso não está presente no espectro calculado, uma vez que este é feito com a molécula isolada.

No espectro experimental foi usado o ácido mercaptopropanóico para obtenção dos espectros SERS. Não foi possível a obtenção do espectro SERS da serotonina sem a adição deste modificador de superfície. Na presença do ácido mercaptopropanóico há a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio, pelas aminas e pela hidroxila, entre o adsorbato e este modificador de superfície. Isto facilitaria a aproximação do grupo indol à superfície para a coordenação ao metal, tornando possível a obtenção do espectro SERS.

A despeito das pequenas diferenças observadas, o espectro teórico obtido apresenta as principais bandas observadas no espectro experimental. A atribuição vibracional para as bandas do espectro SERS desta espécie é apresentada na Tabela 3, e a estrutura otimizada no cálculo, na Figura 26.



**Figura 26:** Estrutura otimizada para a serotonina interagindo com um átomo de ouro.



**Tabela 3:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para as bandas do espectro SERS da serotonina adsorvida em ouro e respectiva atribuição vibracional.

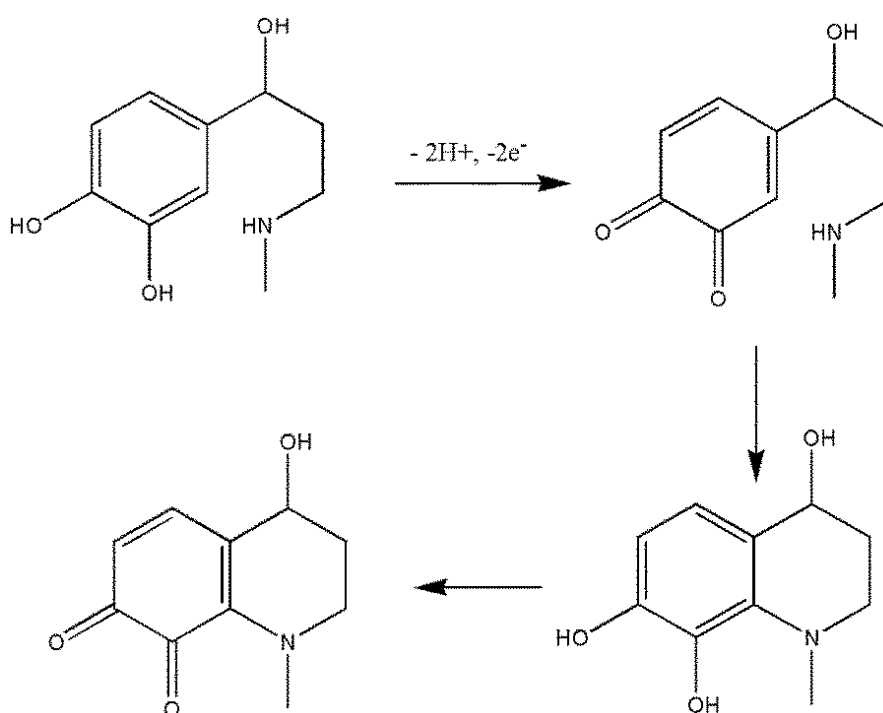
Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa
Experimental	Calculado	
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$		
-	755	$\delta (\text{CC})_{\text{an}}$
879	879	$\gamma (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{NH})_{\text{an}}$
1047	1117	$\nu (\text{C}^{16}\text{C}^{19}) + \omega (\text{NH}_2)$
1087	1140	$\nu (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}}$
1231	1268	$\delta (\text{CH} + \text{NH})_{\text{an}}$
1277	1355	$\nu (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{CH})_{\text{an}}$
1457	1519	$\nu (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{CH})_{\text{an}}$
1487	1547	$\nu (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{CH})_{\text{an}}$

Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\rho$ : pêndulo (*rocking*); an: anel indólico.

De acordo com a atribuição vibracional, pode-se observar que os modos mais intensificados são aqueles referentes ao anel indólico, que por possuir grande número de elétrons  $\pi$ , leva a grandes variações na polarizabilidade molecular com a vibração e consequente elevado sinal Raman e SERS. De acordo com o modelo teórico, os modos que possuem componentes perpendiculares à superfície metálica também intensificaram, comprovando que a adsorção se dá pelo átomo de nitrogênio do anel indólico.

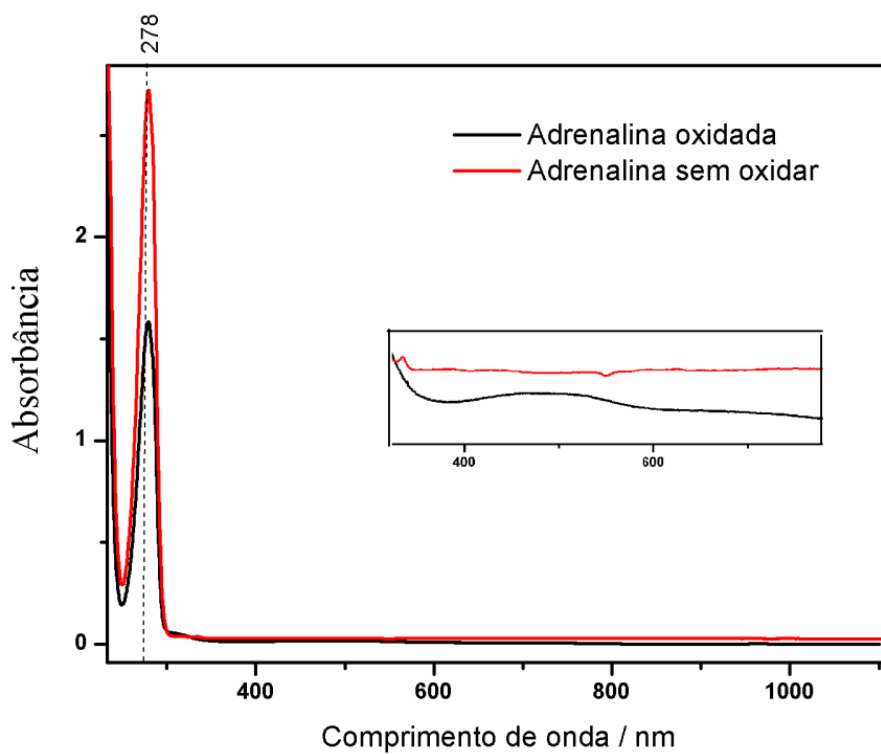
### 4.2.2 Adrenalina

A adrenalina sofre processo de oxidação irreversível (Moore, Banks e Compton, 2004), e a posição do máximo no espectro eletrônico desta molécula depende da espécie em questão. Na literatura existe certo conflito sobre o produto final no processo de oxidação da adrenalina (Zhang *et al.*, 2002; Chen e Peng, 2003), sendo que em superfície de ouro a reação de oxidação foi proposta por Yang e colaboradores (Yang *et al.*, 2007), e está representada na Figura 27.



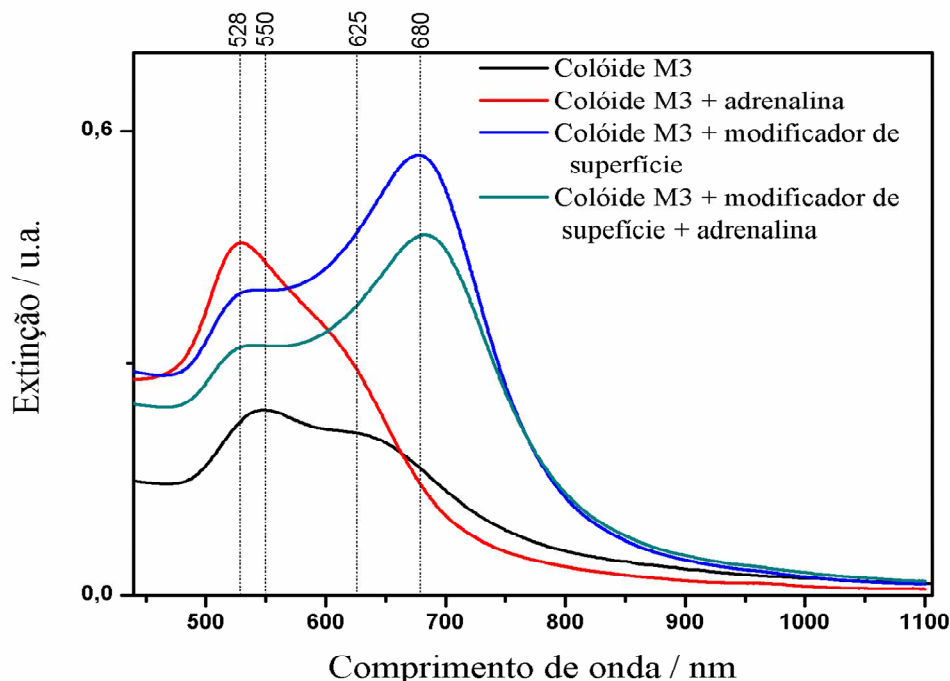
**Figura 27:** Reação de oxidação da adrenalina.

A adrenalina sofre oxidação espontânea em solução aquosa, sendo que a espécie neutra é incolor, e a oxidada apresenta coloração rósea. A Figura 28 apresenta o espectro eletrônico da adrenalina antes e após a oxidação. A espécie antes de sofrer oxidação apresenta uma única banda em 278 nm, e a espécie oxidada apresenta esta mesma banda com menor valor de absorvidade molar, além de uma banda pouco intensa centrada em 480 nm.



**Figura 28:** Espectro eletrônico de solução aquosa de adrenalina ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) neutra e oxidada, com caminho óptico de 0,5 cm.

Os espectros de extinção do colóide de ouro M3 na presença de adrenalina e de 2-mercaptoetanol são apresentados na Figura 29.

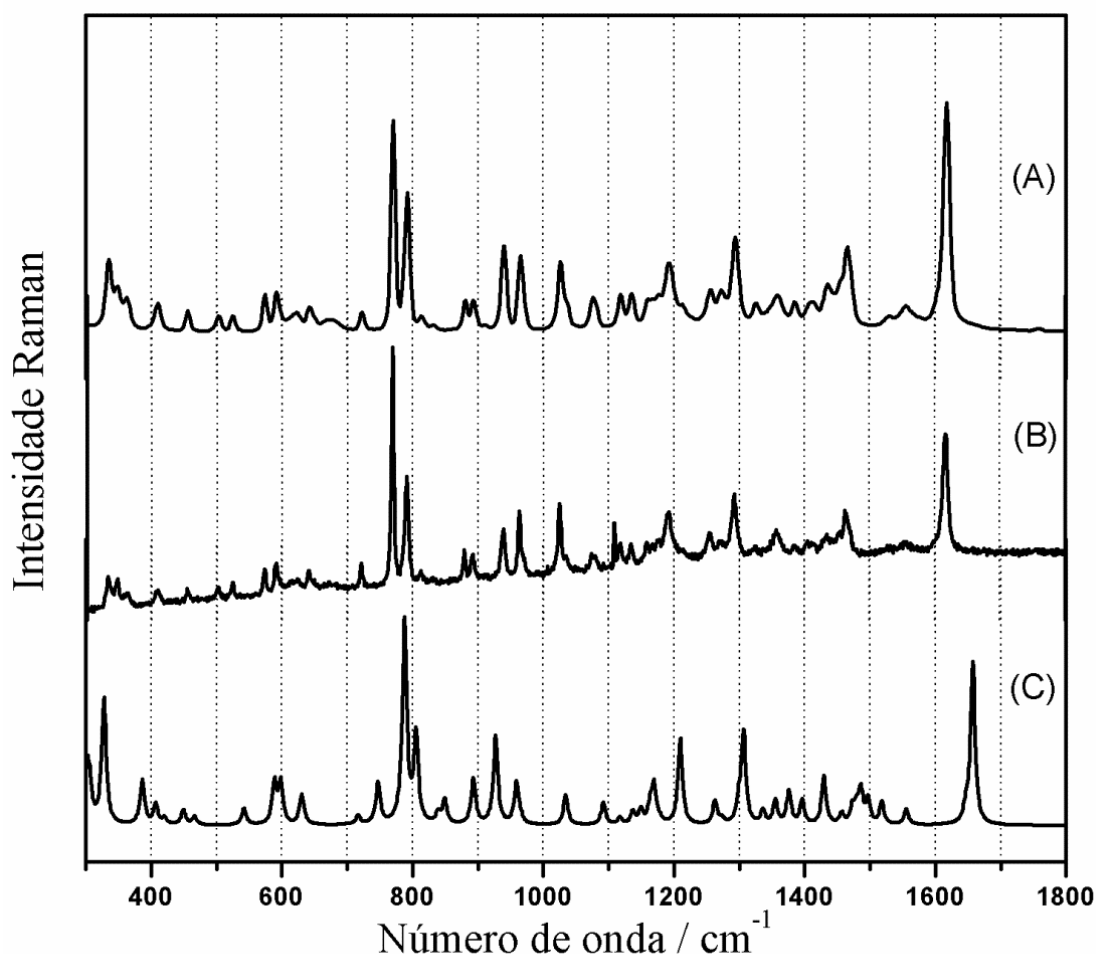


**Figura 29:** Espectro de extinção do colóide M3 na presença de solução aquosa de adrenalina ( $1.10^{-3}$  mol.L $^{-1}$ ) e de 2-mercaptoetanol ( $1.10^{-3}$  mol.L $^{-1}$ ), com caminho óptico de 0,5 cm.

Com a adição de adrenalina ao colóide M3 ocorreu deslocamento do máximo da banda LSPR para menores comprimentos de onda. Na presença de 2-mercaptoetanol, observa-se que a banda LSPR do colóide M3 foi deslocada para maiores comprimentos de onda. O ombro localizado em 625 nm passou a ser a banda mais intensa, e o máximo foi deslocado para 680 nm, e a banda mais intensa do colóide em 550 nm diminuiu de intensidade, sendo deslocada para 530 nm. Portanto apenas o uso do modificador de superfície levou ao aumento dos tamanhos das AuNPs. Quando a adrenalina foi adicionada ao colóide na presença do modificador de superfície, não se observou grandes mudanças na posição dos máximos, foi observada somente ligeira diminuição da intensidade. Através dos espectros LSPR não é possível determinar se a adrenalina se encontra como espécie oxidada, uma vez que a banda característica desta espécie – em 480 nm, e com fraca intensidade – pode estar encoberta pela banda LSPR do colóide, que se encontra na mesma região e apresenta intensidade apreciável.

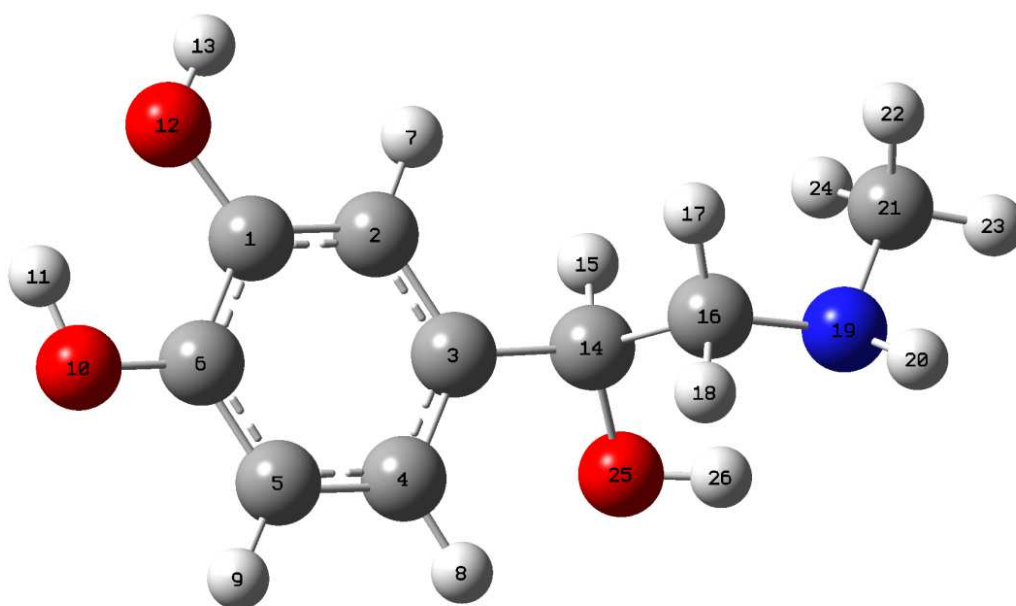
Os espectros Raman da adrenalina foram obtidos com radiações excitantes em 1064 nm e em 632,8 nm, e são apresentados na Figura 30, juntamente com o espectro

teórico obtido para esta molécula. Como pode ser observado existe boa correlação entre os espectros nas duas radiações excitantes e o espectro teórico.



**Figura 30:** Espectro Raman da adrenalina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A), 632,8 nm (B) e espectro teórico da adrenalina (C).

Nenhuma das radiações excitantes utilizada estava em ressonância com transições eletrônicas da molécula (ver Figura 28), por isso as intensidades relativas entre as bandas nos espectros da Figura 30A e B são bastante semelhantes. A atribuição vibracional para as bandas do espectro Raman e a comparação entre os valores de número de onda para os espectros experimental e teórico da adrenalina são descritos na Tabela 4 e a estrutura otimizada obtida para esta espécie é apresentada na Figura 31.



**Figura 31:** Estrutura otimizada para a adrenalina.

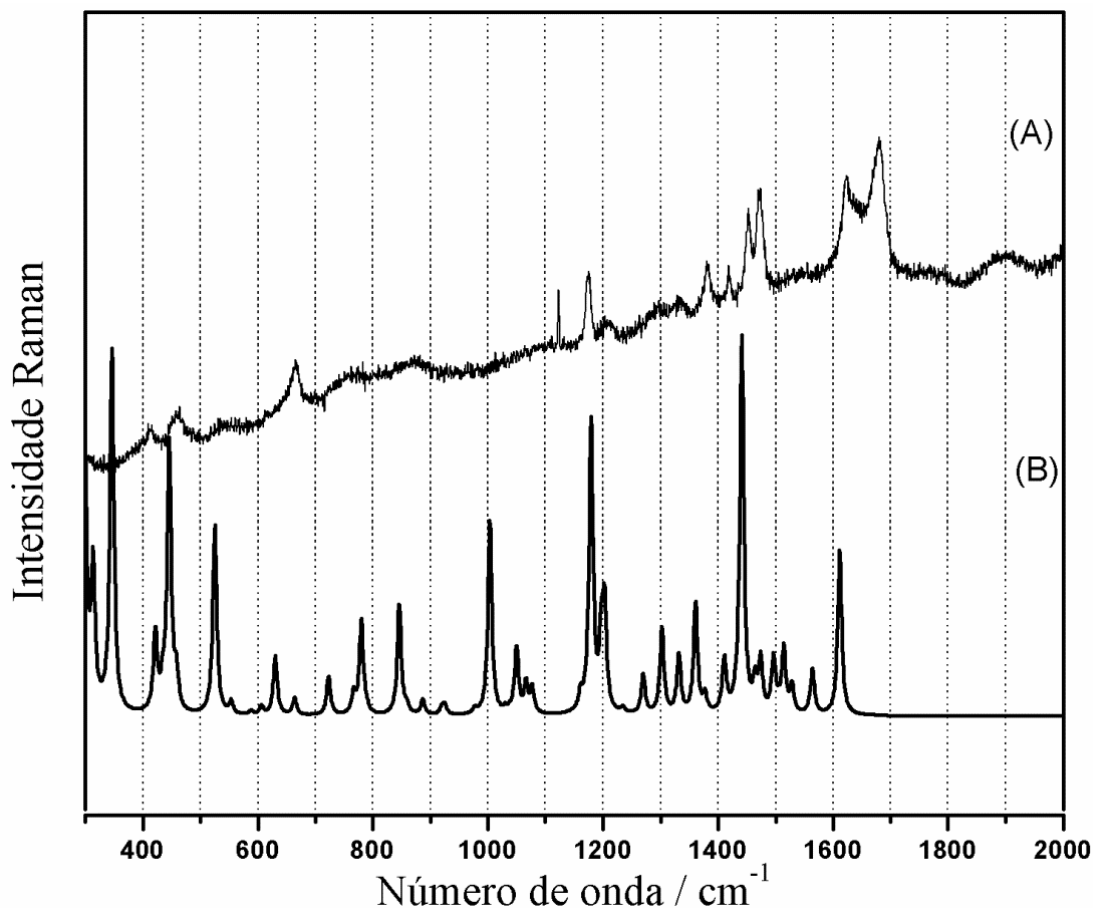
**Tabela 4:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para as bandas do espectro Raman da adrenalina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Calculado	Atribuição tentativa
Experimental			
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$	$\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$		
335	332	327	$\gamma (\text{CC})_{\text{an}}$
573	572	589	$\delta (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{O}^{25}\text{H})$
593	591	598	$\delta (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{O}^{25}\text{H})$
769	769	787	$\delta (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{NH})$
791	791	805	$\delta (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{NH})$
940	937	927	$\nu (\text{CN})_{\text{sim}}$
966	963	959	$\nu (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{CH})_{\text{an}}$
1027	1024	1034	$\omega (\text{CH}_2) + \nu (\text{C}^{16}\text{C}^{14})$
1191	1191	1209	$\delta (\text{O}^{10}\text{H}) + \delta (\text{CH})_{\text{an}}$
1294	1291	1306	$\nu (\text{CC} + \text{CO})_{\text{an}}$
1434	1432	1429	$\delta (\text{O}^{25}\text{H} + \text{C}^{14}\text{H}) + \omega (\text{C}^{16}\text{H}_2)$
1466	1462	1486	$\eta (\text{CH}_3)$
1617	1615	1657	$\nu (\text{CC})_{\text{an}}$

Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\omega$ : abano (*wagging*);  $\rho$ : pêndulo (*rocking*);  $\tau$ : torção (*twist*);  $\sigma$ : tesoura; an: anel; sim: simétrico.

As bandas mais intensas dos espectros experimentais – 769, 791 e 1617  $\text{cm}^{-1}$  referem às respectivas bandas do espectro calculado 787, 805 e 1657  $\text{cm}^{-1}$ , e podem ser atribuídas aos modos de deformação angular no plano e estiramento CC do anel aromático.

O espectro SERS da adrenalina foi obtido em duas radiações 514,5 nm e 1064 nm. Na Figura 32 é apresentado o espectro SERS da adrenalina com radiação excitante em 514,5nm.



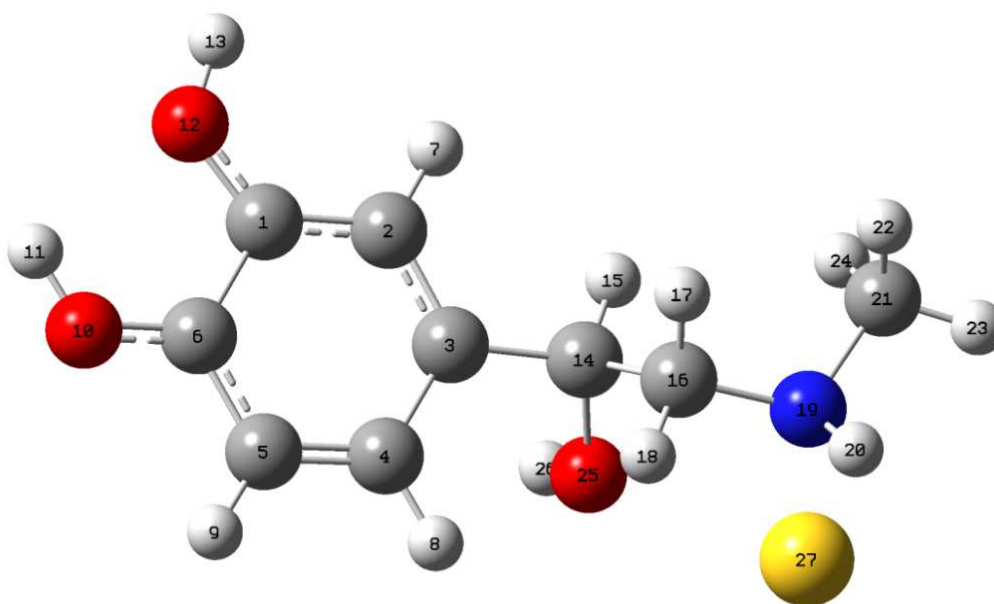
**Figura 32:** Espectro SERS da adrenalina ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em coloide de ouro na presença de propanotiol, com radiação excitante em 514,5 nm (A); espectro teórico do complexo de superfície formado entre a adrenalina e o ouro (B).

Apesar de algumas diferenças observadas, o espectro experimental e teórico para a adrenalina adsorvida em coloide de ouro concordam de maneira satisfatória. Pode-se comparar o espectro SERS apresentado na Figura 32, com o espectro Raman da adrenalina livre, Figura 30. Observa-se que grande parte das bandas, presentes no espectro SERS, está também presente no espectro Raman, por exemplo, os modos em  $1175$ ,  $1418$ ,  $1472$  e  $1623 \text{ cm}^{-1}$  no espectro SERS correspondendo a  $1191$ ,  $1434$ ,  $1466$  e  $1617 \text{ cm}^{-1}$  no espectro Raman, respectivamente. A partir dessas considerações, pode-se afirmar que a espécie predominante sobre as AuNPs quando há propanotiol, é a adrenalina não oxidada.



Para obtenção dos espectros SERS da espécie não oxidada houve necessidade da adição do modificador de superfície, pois o propanotiol facilita o ancoramento da biomolécula à superfície metálica ao formar ligações de Van der Waals com o adsorbato.

A Tabela 5 resume os valores de número de onda para as bandas do espectro SERS experimental e calculado para a adrenalina adsorvida em colóide de ouro e sua respectiva atribuição vibracional. A estrutura otimizada para a adrenalina adsorvida em colóide de ouro pelo átomo de nitrogênio da amina é apresentada na Figura 33.



**Figura 33:** Estrutura otimizada para a adrenalina adsorvida em superfície de ouro.

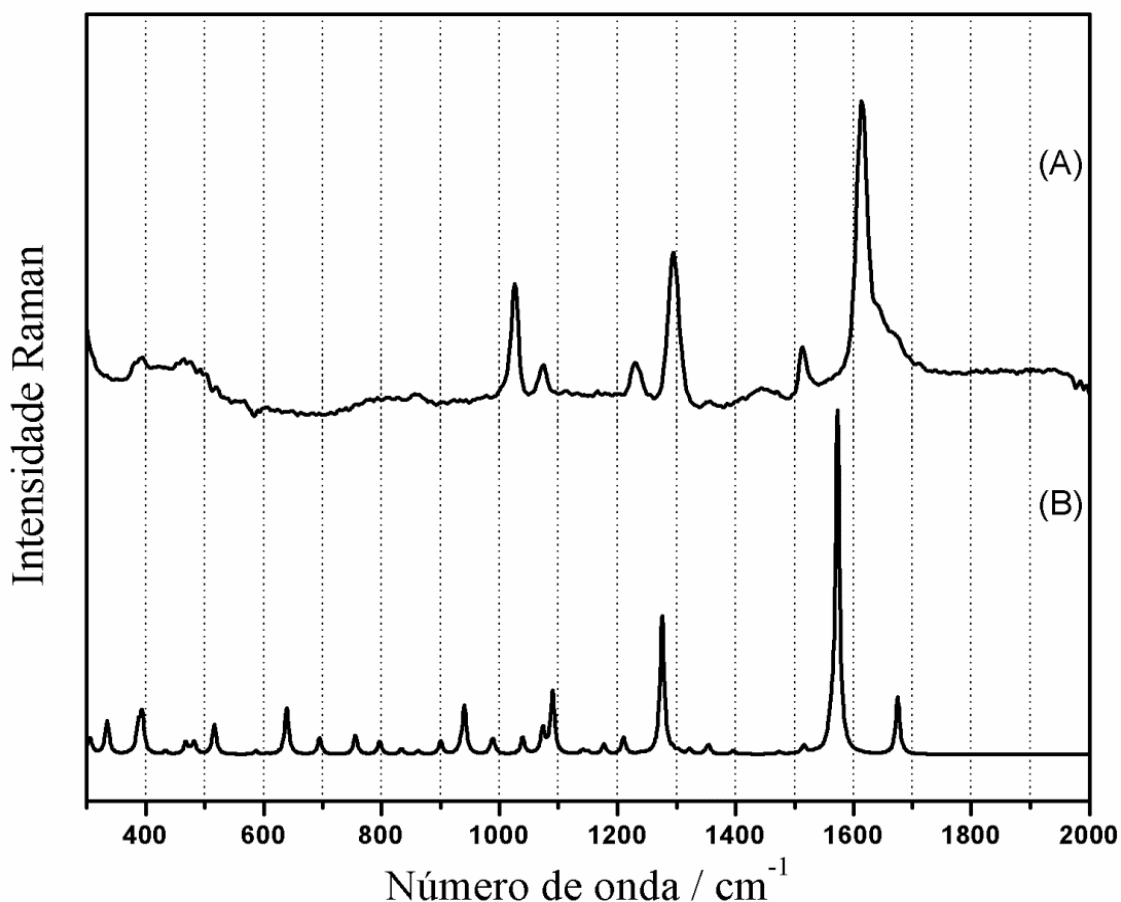
**Tabela 5:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas do espectro SERS da adrenalina em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da adrenalina adsorvida em superfície de ouro, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa
Experimental	Calculado	
$\lambda_0 = 514 \text{ nm}$		
413	421	$\delta (\text{CC})_{\text{an}}$
462	446	$\delta (\text{CNC})$
667	630	$\gamma (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{OH})_{\text{an}}$
1175	1179	$\nu (\text{C}^3\text{C}^{14}) + \delta (\text{NH}) + \delta (\text{CH}_3)$
1380	1361	$\delta (\text{C}^{14}\text{H} + \text{C}^{16}\text{H})$
1418	1413	$\omega (\text{C}^{16}\text{H}) + \delta (\text{NH}) + \delta (\text{C}^{14}\text{H})$
1451	1441	$\nu (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{OH} + \text{CH})_{\text{an}}$
1472	1474	$\eta (\text{CH}_3)$
1623	1611	$\nu (\text{CC})_{\text{an}} + \delta (\text{CH})_{\text{an}}$
1679	-	$\delta (\text{H}_2\text{O})?$

Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\omega$ : abano (*wagging*);  $\eta$ : sombrinha (*umbrella*); an: anel.

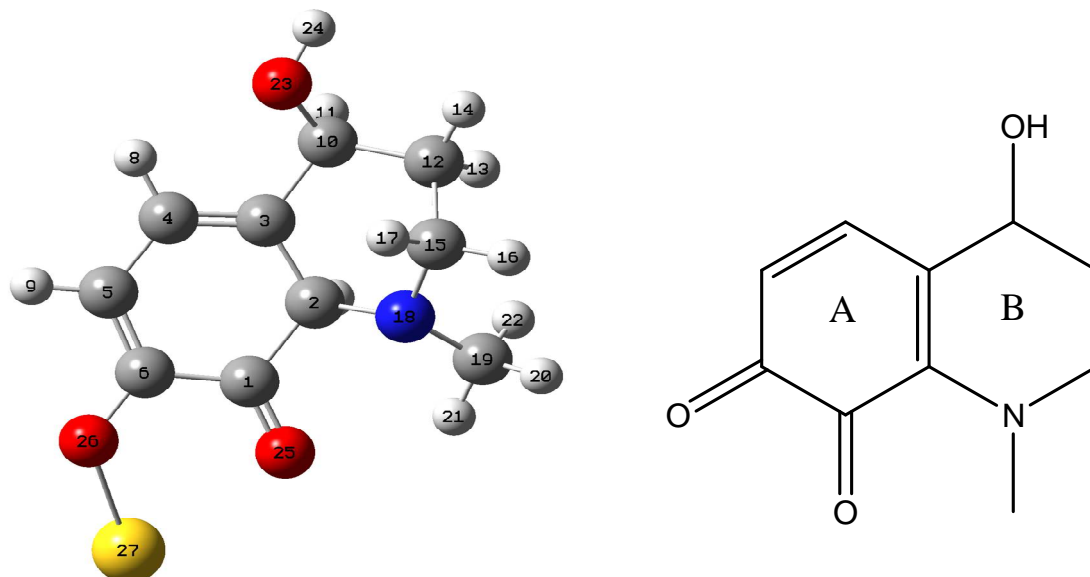
Os modos vibracionais mais intensificados são aqueles associados ao átomo de nitrogênio da amida, ou os que estão perpendiculares à superfície de ouro, quando a adsorção se dá pelo átomo de nitrogênio. As bandas 1472 e 1441  $\text{cm}^{-1}$  mostram bastante bem as diferenças de intensidade que se referem aos modos que estão perpendiculares ou paralelos à superfície. A banda em 1472  $\text{cm}^{-1}$ , por exemplo, é observada com intensidade apreciável, este modo se refere à deformação angular do  $\text{CH}_3$ , e é um movimento com a componente vertical à superfície de ouro, enquanto que o estiramento CC do anel – 1441  $\text{cm}^{-1}$  – é um movimento paralelo à superfície metálica, logo, a banda referente ao primeiro modo foi mais intensificada.

A espécie oxidada é uma base de Lewis mais efetiva do que a espécie não oxidada, apresentando maior facilidade em adsorver ao metal. O espectro SERS da adrenalina também foi obtido com radiação excitante em 1064 nm. Para obtenção deste foi utilizado o coloide de ouro sem adição de modificador de superfície, na expectativa de comprovar se a espécie oxidada estaria presente na superfície. A solução de adrenalina utilizada foi preparada pouco antes da adição ao coloide, e a medida foi feita cerca de três horas após a mistura. Como a espécie não oxidada apresenta dificuldade de adsorção na ausência do modificador de superfície, a espécie que adsorveu à NP de ouro foi a espécie oxidada, uma vez que esta se forma pouco tempo após o preparo da solução de adrenalina. A Figura 34 mostra o espectro SERS da adrenalina com radiação excitante em 1064 nm, juntamente com o espectro teórico da adrenalina oxidada adsorvida pela carbonila do anel, este foi o espectro calculado que mais concordou com o espectro experimental.



**Figura 34:** Espectros SERS da adrenalina oxidada ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em coloide de ouro, com radiação excitante em 1064 nm (A); espectro teórico do complexo de superfície formado entre adrenalina oxidada e ouro.

A Figura 35 apresenta a estrutura otimizada da espécie oxidada adsorvida à superfície de ouro, sendo que a adsorção ocorre pelos átomos de oxigênio das duas carbonilas ligadas ao anel. Os valores de número de onda obtidos para o espectro SERS da adrenalina oxidada e a respectiva atribuição dos modos vibracionais são apresentados na Tabela 6.



**Figura 35:** Estrutura otimizada da adrenalina oxidada adsorvida em superfície de ouro.

**Tabela 6:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas do espectro SERS da adrenalina oxidada em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da adrenalina oxidada adsorvida em superfície de ouro, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa
Experimental	Calculado	
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$		
1025	1073	$\nu (\text{C}^{10}\text{O}^{23} + \text{CC}(\text{anel A}))$
1073	1089	$\nu (\text{C}^2\text{N}^{18} + \text{C}^2\text{C}^1 + \text{C}^2\text{C}^3) + \omega (\text{C}^{19}\text{H}_3) + \delta (\text{C}^4\text{H})$
1230	1210	$\tau (\text{C}^{12}\text{H}_2)$
1296	1275	$\nu (\text{C}^5\text{O}^{26}) + \delta (\text{C}^5\text{H})$
1512	1516	$\sigma (\text{C}^{15}\text{H}_2)$
1611	1573	$\nu (\text{C}^1\text{O}^{25} + \text{C}^6\text{C}^5)$
1644	1674	$\nu (\text{C}^3\text{C}^4)$
1670 (sh)	-	$\delta (\text{H}_2\text{O})?$

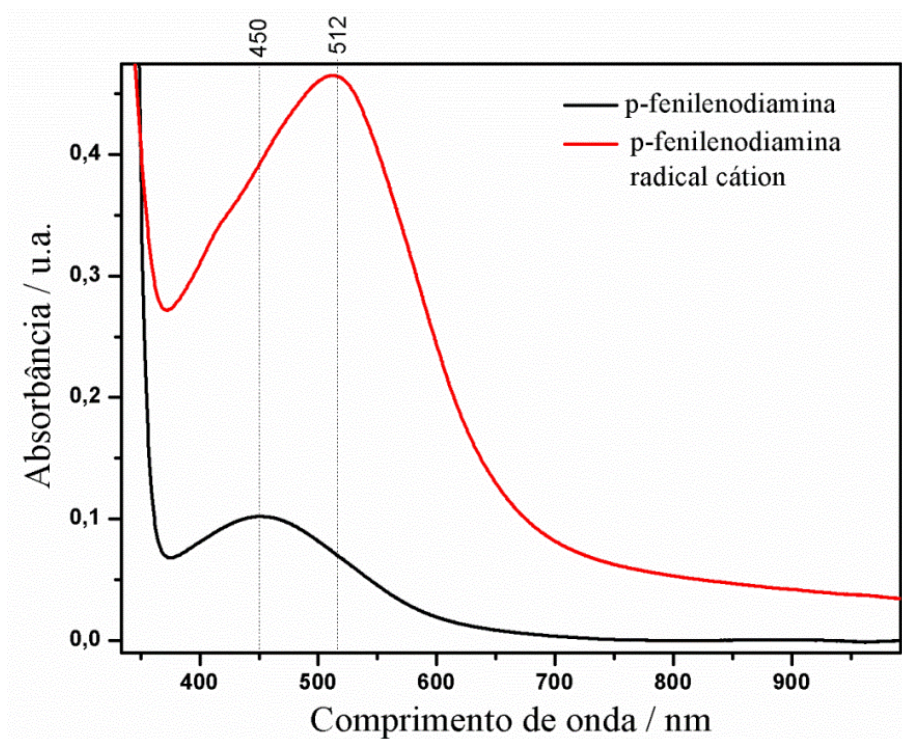
Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\nu$ : estiramento;  $\rho$ : pêndulo (*rocking*);  $\tau$ : torção (*twist*),  $\sigma$ : tesoura; sh: ombro.

Como se pode observar há boa concordância entre os espectros SERS teórico e experimental, confirmando assim que quando não há adição de um modificador de superfície a adrenalina se encontra oxidada na superfície metálica. Além disso, se o espectro SERS obtido em 1064 nm for comparado ao espectro Raman da adrenalina livre, há grandes diferenças, por exemplo no modos em  $1450 \text{ cm}^{-1}$ , que possui contribuição do grupo hidroxila do anel, está presente no espectro Raman e no SERS da espécie não oxidada e ausente no espectro da Figura 34. A banda mais intensa no espectro experimental está em  $1611 \text{ cm}^{-1}$  e atribuída ao estiramento CC e CO, e esta é também a banda mais intensa do espectro teórico, em  $1573 \text{ cm}^{-1}$ . As outras duas bandas mais intensas no espectro experimental – em  $1025$  e  $1296 \text{ cm}^{-1}$  – são atribuídas ao sítio

de adsorção (estiramento CC do anel ou estiramento  $C^6O^{26}$ ) ou a vibrações que se encontram perpendiculares a superfície metálica (deformação angular  $C^5H$  e  $C^{10}O^{23}$ ).

### 5.2.3 para-Fenilenodiamina

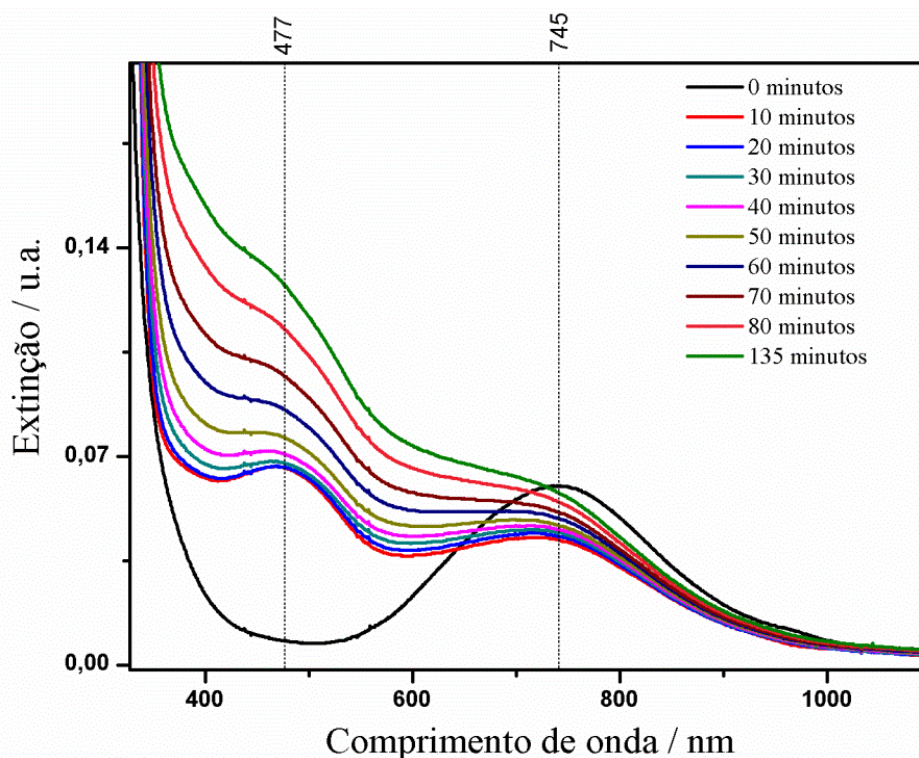
O adsorbato p-fenilenodiamina foi o selecionado para a obtenção dos espectros SERS com as CuNPs. Encontra-se relatado na literatura a oxidação espontânea da p-fenilenodiamina em meio aquoso, pela formação de radical cátion (Chipman, Sun e Tripathi, 1992). A Figura 36 apresenta o espectro eletrônico da p-fenilenodiamina e do radical cátion por ela formado em meio aquoso.



**Figura 36:** Espectro eletrônico da p-fenilenodiamina ( $1.10^{-3}$  mol.L $^{-1}$ ) em solução aquosa e do radical cátion ( $1.10^{-3}$  mol.L $^{-1}$ ) em solução aquosa.

A p-fenilenodiamina como espécie neutra apresenta uma banda com máximo de absorção em 450 nm, enquanto que a espécie oxidada, em 512 nm. Observa-se deslocamento para a região do vermelho do espectro eletromagnético, e aumento no valor de absorvidade molar quando há oxidação, uma vez que ambas as espécies se encontram na mesma concentração molar. A oxidação dessa espécie ocorre em solução aquosa, e é um processo espontâneo. Após alguns dias de preparada a espécie neutra é oxidada, podendo ser observada alteração na coloração da solução - de amarelo para

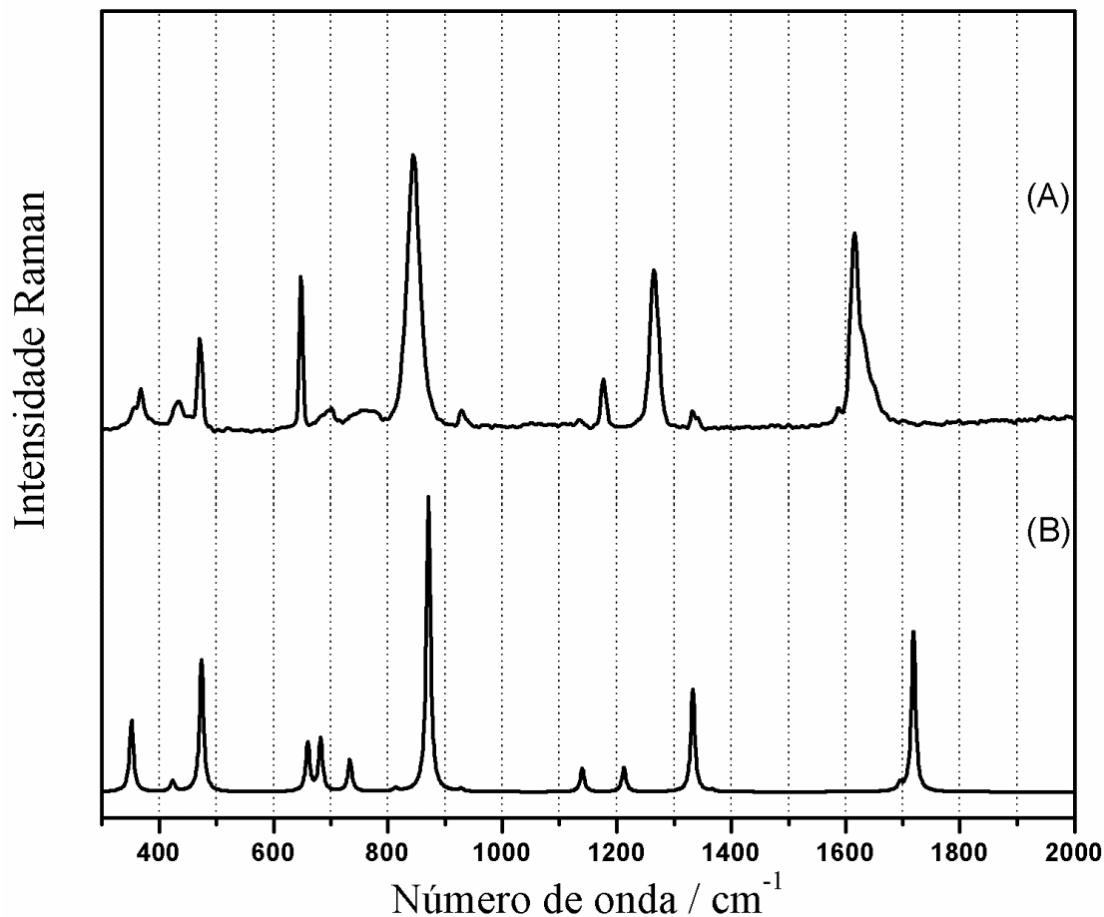
vermelho-vinho. A Figura 37 apresenta o estudo cinético da mistura entre o coloide de cobre e a solução aquosa de p-fenilenodiamina, quando isto ocorre há significativo deslocamento das bandas. Na legenda, 0 minutos refere-se ao coloide de cobre sem adição do adsorbato, e as demais marcações de minutos simbolizam o tempo a quanto tempo após a mistura entre coloide e adsorbato em que o espectro foi obtido.



**Figura 37:** Espectro de extinção do coloide de cobre na ausência/presença de p-fenilenodiamina ( $1.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>).

Para o coloide de cobre a banda LSPR é deslocada para menores comprimentos de onda, enquanto que a banda de absorção da p-fenilenodiamina é deslocada para maiores comprimentos de onda. No coloide sintetizado tem-se um sistema caroço-casca Cu@CuO, e a banda que se observa em 745 nm se refere a transição do óxido de cobre (II) (Yin *et al.*, 2005; Pastoriza-Santos *et al.*, 2009). Quando a p-fenilenodiamina é adicionada, o Cu(II) é reduzido a Cu(0), justificando o aparecimento da banda do plasmon de superfície com progressivo deslocamento para menores comprimentos de onda. Após 135 minutos da mistura o espectro representa a sobreposição das bandas LSPR das CuNPs e da p-fenilenodiamina como radical cátion.

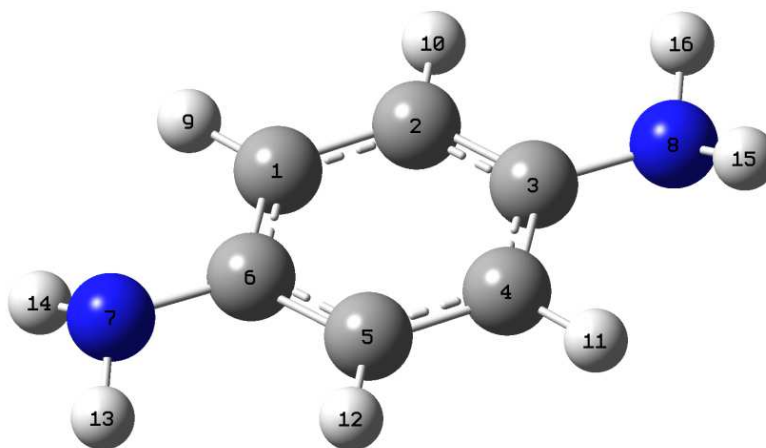
O espectro Raman da p-fenilenodiamina foi obtido com radiação excitante em 1064 nm, e está apresentado na Figura 38, juntamente com o espectro Raman teórico desta espécie.



**Figura 38:** Espectro Raman da p-fenilenodiamina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A) e espectro teórico da p-fenilenodiamina (B).

Como se pode observar há grande concordância entre o espectro teórico e o experimental. O espectro vibracional da p-fenilenodiamina neutra, bem como do radical cátion está bem descrito na literatura (Chipman, Sun e Tripathi, 1992; Akalin e Akyüz, 2000; Bailey, Zink e Nelsen, 2003). A estrutura otimizada obtida através do cálculo é apresentada na Figura 39, e na Tabela 7 estão apresentados os valores de número de onda para as bandas do espectro Raman da p-fenilenodiamina e sua respectiva atribuição vibracional.





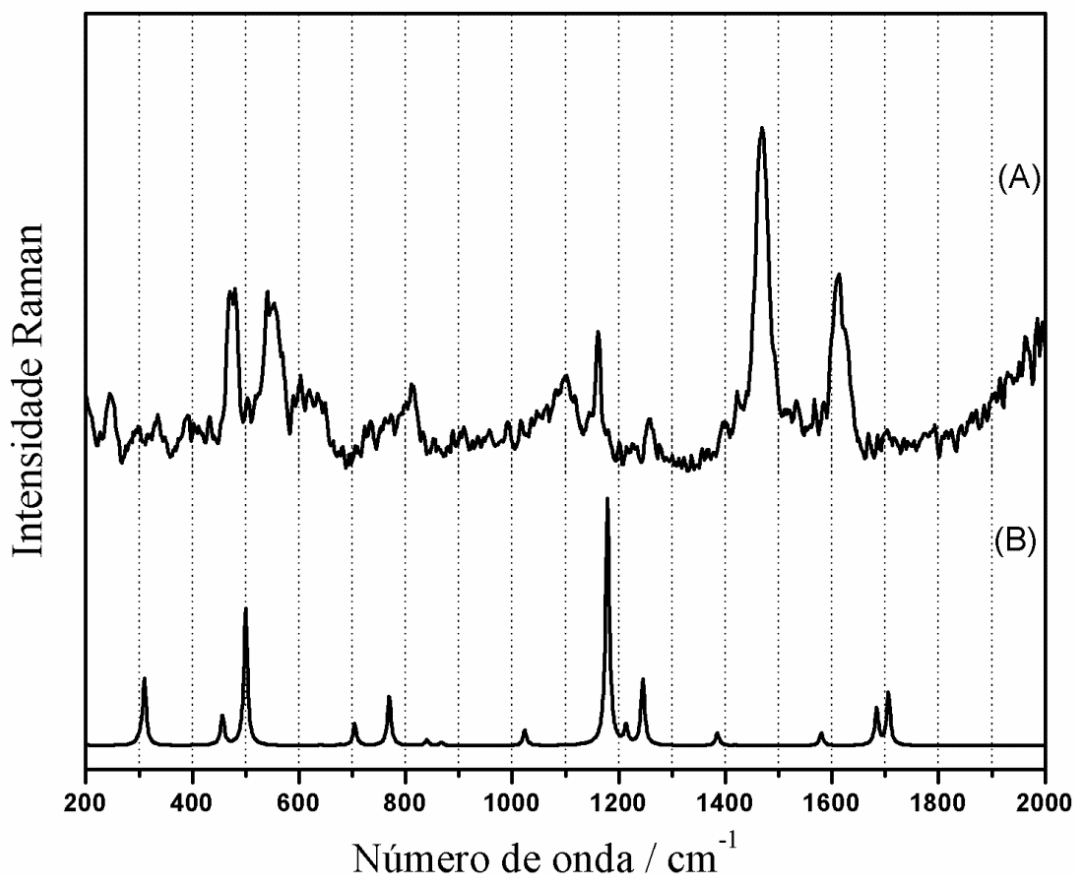
**Figura 39:** Estrutura otimizada para a p-fenilenodiamina.

**Tabela 7:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para as bandas do espectro Raman da p-fenilenodiamina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa
Experimental	Calculado	
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$		
366	352	$\gamma$ (CC)
436	474	$\delta$ (CC)
648	659	$\delta$ (CC)
843	870	$\nu$ (CC + CN)
1176	1140	$\delta$ ( $\text{NH}_2$ ) + $\nu$ (CC)
1264	1333	$\nu$ (CN + CC)
1615	1695	$\nu$ (CC) + $\delta$ ( $\text{NH}_2$ )
1625 (sh)	1718	$\delta$ ( $\text{NH}_2$ ) + $\nu$ (CC)

Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento; sh: ombro.

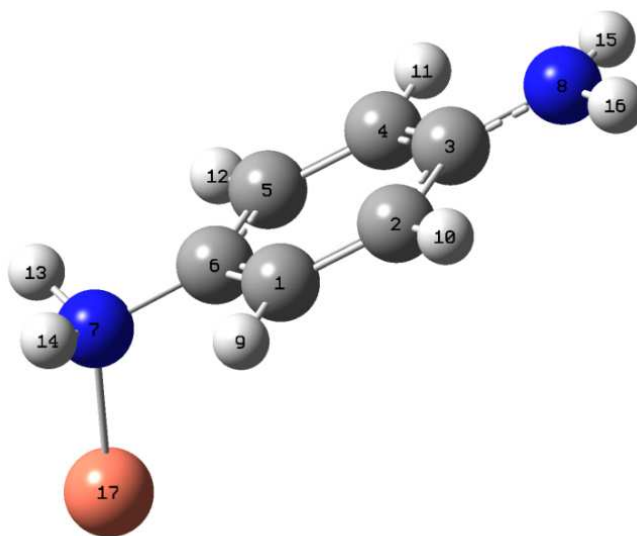
O espectro SERS obtido foi do radical cátion, uma vez que adsorvida à superfície de cobre ocorre a oxidação da p-fenilenodiamina e a redução do CuO da superfície. Para obtenção do espectro foi utilizada a radiação excitante em 1064 nm, e encontra-se apresentado na Figura 40 juntamente com o espectro teórico da espécie adsorvida em coloide de cobre.



**Figura 40:** Espectro SERS da p-fenilenodiamina radical cátion ( $1.10^{-3}$  mol.L $^{-1}$ ) adsorvida em coloide de cobre, com radiação excitante em 1064 nm (A); espectro Raman teórico do complexo de superfície formado entre a p-fenilenodiamina e a superfície de cobre (B).

O espectro SERS apresenta diferenças em relação ao espectro Raman da espécie sólida, principalmente por três razões: primeiramente a oxidação da p-fenilenodiamina; segundo porque a molécula perde simetria quando adsorvida à superfície metálica, além das regras de seleção de superfície. É conhecido que tanto a p-fenilenodiamina quanto o radical cátion apresentam simetria que corresponde ao grupo de ponto  $D_{2h}$  (Chipman, Sun e Tripathi, 1992). Para sistemas com esta geometria as bandas observadas no espectro infravermelho não são esperadas no espectro Raman, devido a presença do

centro de simetria. Quando a p-fenilenodiamina está adsorvida por coordenação com o metal, a perda de simetria permite a observação de bandas do infravermelho no espectro SERS. Tal proposta está de acordo com a presença da banda em  $1625\text{ cm}^{-1}$  observada no espectro SERS que é ativa no infravermelho (Akalin e Akyüz, 2001). A estrutura otimizada para a p-fenilenodiamina adsorvida ao cobre é apresentada na Figura 41, e na Tabela 8 encontram-se sumarizados os valores de número de onda para as bandas do espectro SERS para a espécie adsorvida, bem como respectiva atribuição vibracional.



**Figura 41:** Estrutura otimizada para a p-fenilenodiamina adsorvida em superfície de cobre.

**Tabela 8:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas do espectro SERS da p-fenilenodiamina adsorvida em colóide de cobre em comparação com o espectro Raman teórico da p-fenilenodiamina adsorvida em superfície de cobre, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa
Experimental	Calculado	
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$		
473	456	$\delta (\text{Cu-NC}) + \gamma (\text{CC})$
538	500	$\nu (\text{Cu-N}) + \gamma (\text{CC})$
811	867	$\nu (\text{CN})_{\text{coord.}} + \delta (\text{Cu-NC})$
1158	1245	$\delta (\text{Cu-NC}) + \delta (\text{NH}_2)_{\text{coord.}}$
1255	1385	$\nu (\text{CN} + \text{CC})_{\text{não coord.}}$
1467	1580	$\nu (\text{CC}) + \delta (\text{Cu-NC})$
1611	1684	$\nu (\text{CC}) + \delta (\text{NH}_2)_{\text{não coord.}}$
1625 (sh)	1706	$\delta (\text{NH}_2)_{\text{não coord.}} + \nu (\text{CC})$

Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento; sh: ombro.

A banda em  $1611 \text{ cm}^{-1}$  observada no espectro SERS da p-fenilenodiamina, atribuída à deformação angular do  $\text{NH}_2$  e ao estiramento CC do anel apresenta relativa diminuição de intensidade em comparação com a correspondente banda do espectro Raman, em  $1615 \text{ cm}^{-1}$ , justificado pela regra de seleção de superfície, uma vez que o anel está inclinado em relação à superfície. No entanto, sabe-se que modos vibracionais envolvendo movimentos moleculares que levam a alta variação da polarizabilidade molecular são ainda observados no espectro SERS (Sant' Ana *et al.*, 2003; Sant'ana *et al.*, 2003; Aguiar *et al.*, 2006).

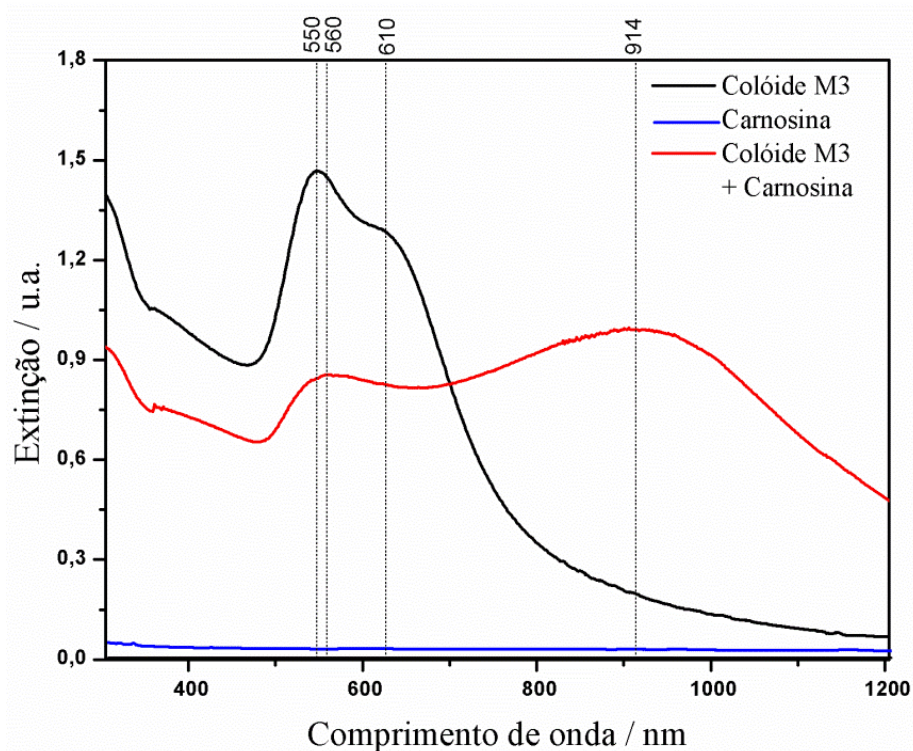
No espectro SERS, a grande intensidade das bandas em  $1467$  e  $1158 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento CN, sugerem que este movimento molecular pertence ao sítio

de adsorção. Do mesmo modo, é observada a intensificação das bandas em 538 e 473  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento CuN e deformação angular CuNC, respectivamente. Adicionalmente, tais modos apresentam em sua composição deformação angular do anel fora do plano, que usualmente correspondem a bandas com fraca intensidade. A relativa intensificação destas bandas pode ser justificada pela regra de seleção de superfície.

Adicionalmente, a banda mais intensa no espectro Raman da p-fenilenodiamina em 843  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento CC do anel e CN, está ausente no espectro SERS devido à perda de simetria molecular. Isto é suportado pelos resultados de DFT para o complexo de superfície, que mostram baixa atividade Raman para estes modos.

#### **4.2.4 L-carnosina**

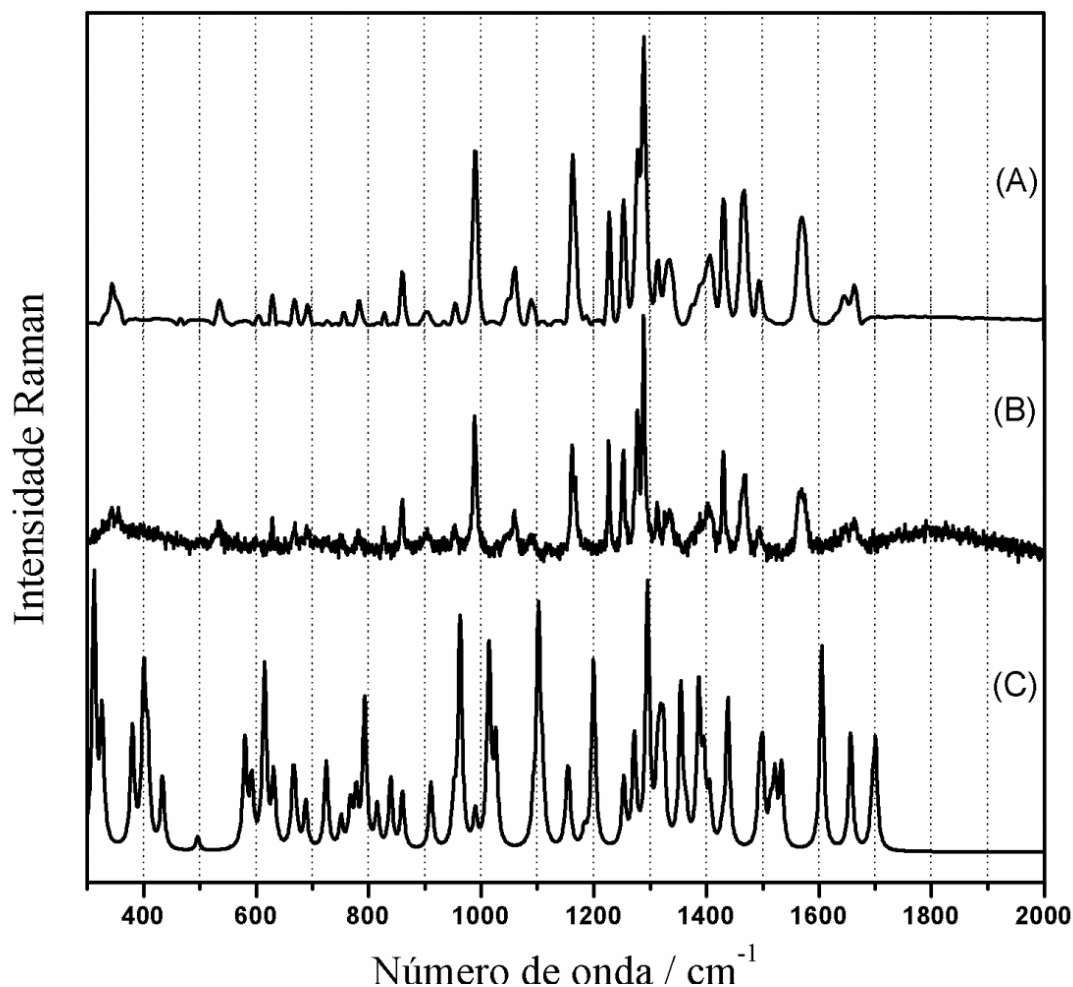
A L-carnosina apresenta boa estabilidade em solução aquosa, não sofrendo oxidação espontânea. O espectro eletrônico dessa espécie apresenta banda em 214 nm, e esta se refere à transição  $\pi-\pi^*$  (Branham *et al.*, 2011), não sendo observadas bandas na região do visível do espectro eletromagnético. O espectro eletrônico da L-carnosina, e o espectro de extinção do coloide de ouro M3 na presença deste adsorbato estão apresentados na Figura 42.



**Figura 42:** Espectros de extinção do colóide M3 na presença e ausência de solução aquosa  $1.10^{-4}$  mol.L $^{-1}$  de L-carnosina, e espectro eletrônico de solução aquosa de L-carnosina ( $1.10^{-3}$  mol.L $^{-1}$ ).

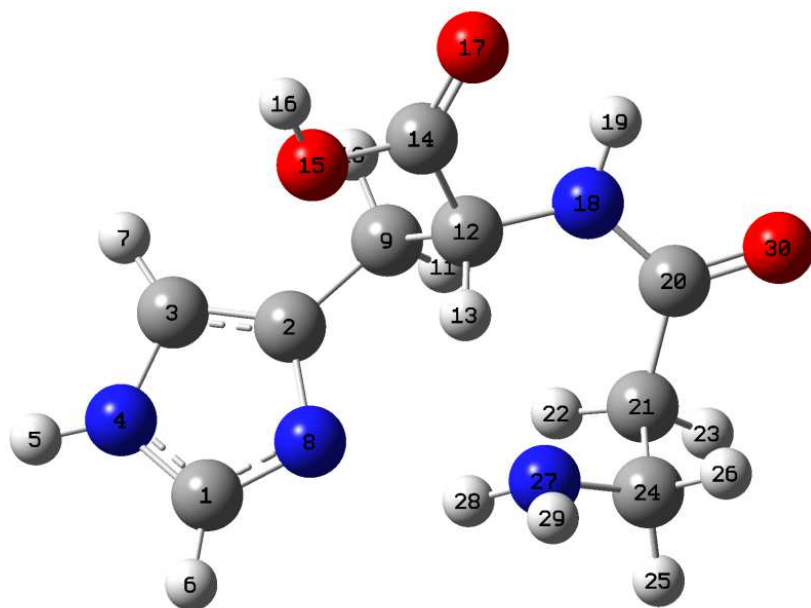
Há forte interação entre o adsorbato e as AuNPs, a banda de extinção do colóide sofre considerável deslocamento na direção do infravermelho próximo quando a solução de L-carnosina é adicionada. O adsorbato promove agregação parcial das NPs, justificado pelo deslocamento do máximo da banda LSPR. A banda em 548 nm – a mais intensa do colóide – sofre pronunciada diminuição de intensidade e é deslocada para 560 nm, enquanto que a banda em 610 nm – apenas um ombro no espectro do colóide – torna-se a mais intensa, e é deslocada para 920 nm. Há também aumento na distribuição de tamanhos das AuNPs, evidenciado pelo alargamento da banda LSPR.

O espectro Raman da L-carnosina foi obtido com radiação excitante em 1064 nm e em 632,8 nm, e estes são apresentados na Figura 43, juntamente com o espectro teórico obtido para esta espécie.



**Figura 43:** Espectro Raman da L-carnosina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A), 632,8 nm (B) e espectro teórico da L-carnosina (C).

Os espectros Raman experimentais são muito parecidos, sendo observadas somente pequenas diferenças nos valores de intensidade relativa, embora o espectro obtido com radiação excitante em 1064 nm tenha melhor razão sinal/ruído. O espectro teórico apresenta maior número de bandas do que os espectros experimentais, devido possivelmente às diferenças de simetria da molécula isolada e na estrutura cristalina. No entanto, as bandas intensas nos espectros experimentais – aproximadamente 989, 1161, 1290, 1430, 1469 e 1575  $\text{cm}^{-1}$  – são também intensas no espectro teórico. Para realizar a atribuição dos espectros além dos cálculos teóricos foi utilizado o trabalho de Diez e Baran (Diez e Baran, 2003), no qual se tem o estudo de DFT para diferentes conformeros da L-carnosina. A Figura 44 apresenta a estrutura otimizada para a L-carnosina, e a Tabela 9, os valores de número de onda para as bandas do espectro Raman da L-carnosina com a respectiva atribuição vibracional.



**Figura 44:** Estrutura otimizada para a L-carnosina.

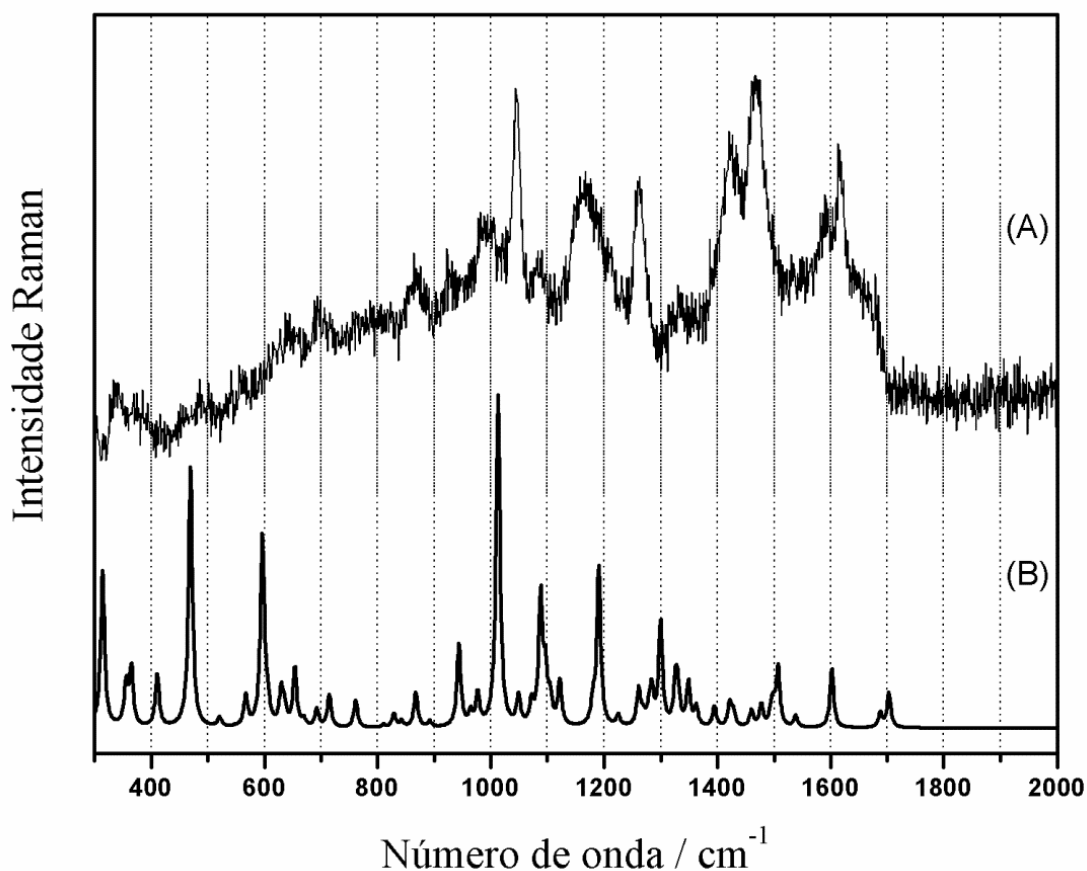


**Tabela 9:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para as bandas do espectro Raman da L-carnosina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Calculado	Atribuição tentativa
Experimental			
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$	$\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$		
861	860	838	$\gamma (\text{CC})_{\text{an}} + \gamma (\text{C}^1\text{H})$
989	989	962	$\delta (\text{C}^2\text{N}^8\text{C}^1)$
1059	1058	1013	$\nu (\text{C}^9\text{C}^{12}) + \omega (\text{C}^9\text{H}_2)$
1091	1091	1102	$\nu (\text{C}^{12}\text{C}^{14}\text{O}^{15})_{\text{assim}} + \delta (\text{O}^{15}\text{H})$
1161	1161	1199	$\tau (\text{C}^9\text{H}_2) + \delta (\text{C}^{12}\text{H} + \text{C}^3\text{H} + \text{C}^1\text{H})$
1228	1227	1253	$\delta (\text{C}^3\text{H} + \text{C}^1\text{H}) + \tau (\text{C}^9\text{H}_2)$
1252	1252	1271	$\tau (\text{C}^{24}\text{H}_2 + \text{C}^{21}\text{H}_2)$
1290	1289	1295	$\nu (\text{C}^2\text{N}^8 + \text{C}^3\text{N}^4) + \delta (\text{C}^1\text{H} + \text{C}^9\text{H}^{10})$
1333	1333	1354	$\omega (\text{C}^9\text{H}_2) + \delta (\text{C}^{12}\text{H}) + \nu (\text{C}^2\text{N}^8)$
1406	1406	1386	$\omega (\text{C}^9\text{H}_2) + \delta (\text{C}^{12}\text{H})$
1429	1432	1437	$\nu (\text{C}^1\text{N}^4) + \delta (\text{C}^1\text{H} + \text{N}^4\text{H})$
1465	1469	1499	$\nu (\text{C}^1\text{N}^8) + \delta (\text{C}^1\text{H} + \text{N}^4\text{H})$
1495	1495	1533	$\sigma (\text{C}^{24}\text{H}_2)$
1568	1567	1605	$\nu (\text{C}^3\text{C}^2) + \delta (\text{C}^3\text{H} + \text{N}^4\text{H})$
1645	-	1656	$\nu (\text{C}^{20}\text{O}^{30}) + \delta (\text{N}^{18}\text{H})$
1662	1664	1700	$\nu (\text{C}^{14}\text{O}^{17}) + \sigma (\text{N}^{27}\text{H}_2) + \delta (\text{O}^{15}\text{H})$

Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\omega$ : abano (*wagging*);  $\tau$ : torção;  $\sigma$ : tesoura (*scissoring*); an: anel, assim: assimétrico.

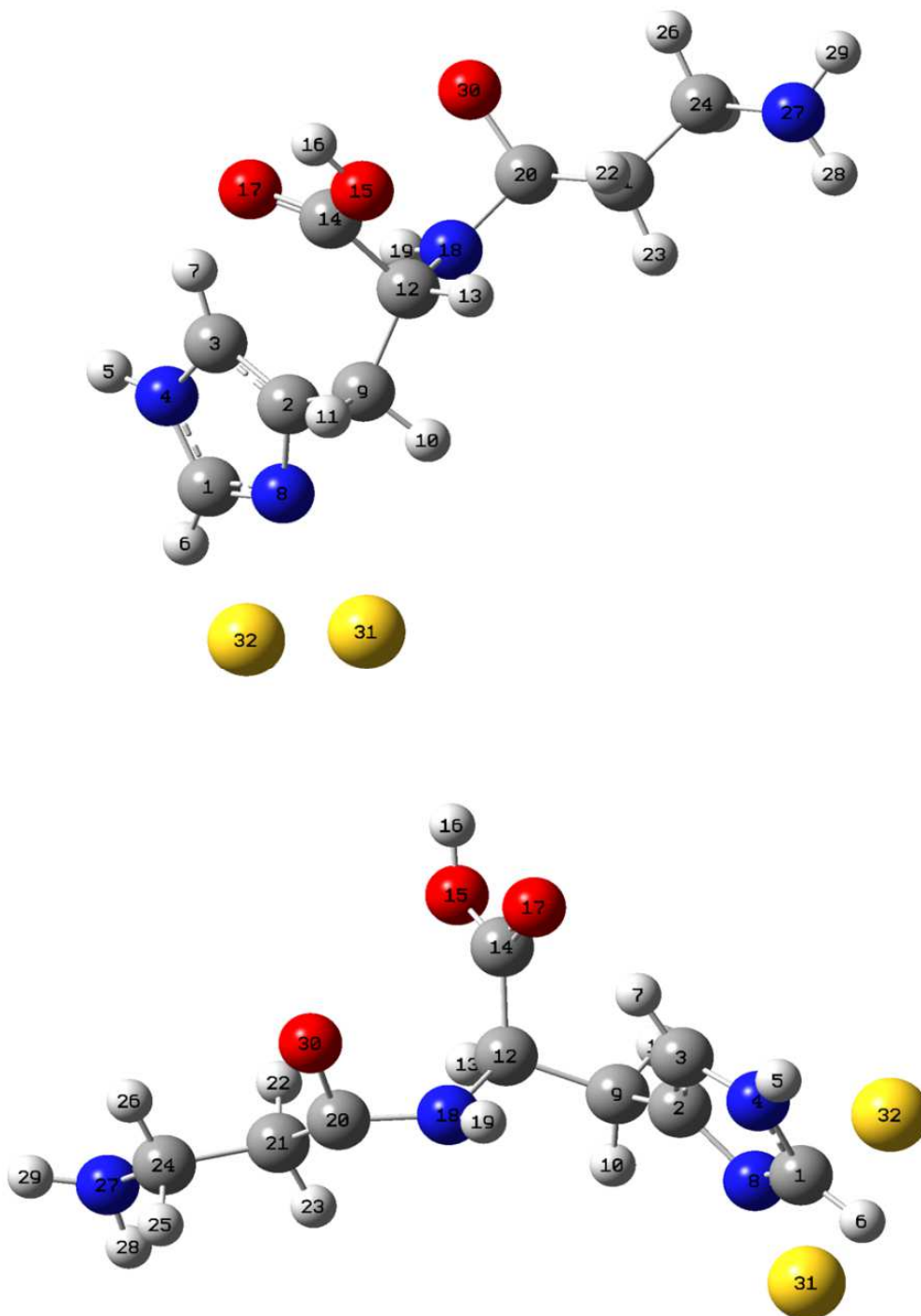
A interação da L-carnosina com metais de transição é amplamente investigada na literatura, principalmente devido à sua ação antioxidante. Há uma série de trabalhos relatando a formação de complexos metálicos entre este ligante e alguns metais, tais como cobre (Decker, Crum e Calvert, 1992), ferro (Decker, Crum e Calvert, 1992), rutênio (Branham *et al.*, 2011) e cádmio (Sarkar e Sarkar, 1997). O espectro SERS da L-carnosina adsorvida em coloide de Au (M3) é apresentado na Figura 45, juntamente com o espectro teórico obtido para a adsorção desta espécie em ouro pelo átomo de nitrogênio do anel imidazólico.



**Figura 45:** Espectro SERS da L-carnosina ( $2 \cdot 10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ) em coloide de ouro (M3) com radiação excitante em 632,8 nm (A); espectro teórico do complexo de superfície formado entre a L-carnosina e o ouro (B).

As bandas em 1044 e 1260  $\text{cm}^{-1}$ , intensas nos espectros SERS, são observada no espectro teórico obtido. A geometria de adsorção da L-carnosina que providenciou espectro mais próximo ao experimental foi através do átomo de nitrogênio do anel imidazólico, ligado a dois átomos de ouro (0), como mostrado na Figura 46. A Tabela

10 apresenta os valores de número de onda para as bandas do espectro SERS da L-carnosina adsorvida em ouro, e respectiva atribuição vibracional.



**Figura 46:** Estrutura otimizada para o complexo de superfície formado entre a L-carnosina e a superfície de ouro, apresentadas em duas perspectivas diferentes.

**Tabela 10:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas espectro SERS da L-carnosina em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da L-carnosina interagindo com dois átomos de ouro, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa
Experimental	Calculado	
$\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$		
868	867	$\nu (\text{C}^{20}\text{C}^{21} + \text{C}^{20}\text{O}^{30}) + \tau (\text{N}^{27}\text{H}_2)$
930	943	$\delta (\text{CC}_{\text{an}} + \text{CN}_{\text{an}} + \text{C}^9\text{C}^{12}\text{N}^{18}) + \rho (\text{C}^9\text{H}_2 + \text{C}^{21}\text{H}_2)$
1044	1012	$\nu (\text{C}^{20}\text{N}^{18} + \text{C}^{20}\text{O}^{30}) + \rho (\text{C}^9\text{H}_2) + \tau (\text{C}^{21}\text{H}_2)$
1087	1087	$\nu (\text{C}^9\text{C}^{12}\text{N}^{18})_{\text{assim}} + \rho (\text{C}^9\text{H}_2)$
1164	1190	$\tau (\text{C}^{21}\text{H}_2 + \text{C}^{24}\text{H}_2) + \rho (\text{N}^{27}\text{H}_2)$
1260	1300	$\nu ((\text{N}^{18}\text{C}^{20}\text{O}^{30})_{\text{sim}} + \text{C}^{20}\text{C}^{21}) + \delta (\text{O}^{15}\text{H})$
1424	1477	$\delta (\text{C}^{12}\text{H} + \text{N}^{18}\text{H})$
1469	1507	$\nu (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}} + \sigma (\text{C}^9\text{H}_2)$
1615	1603	$\nu (\text{C}^3\text{C}^2)$
-	1702	$\nu (\text{C}^{14}\text{O}^{17})$

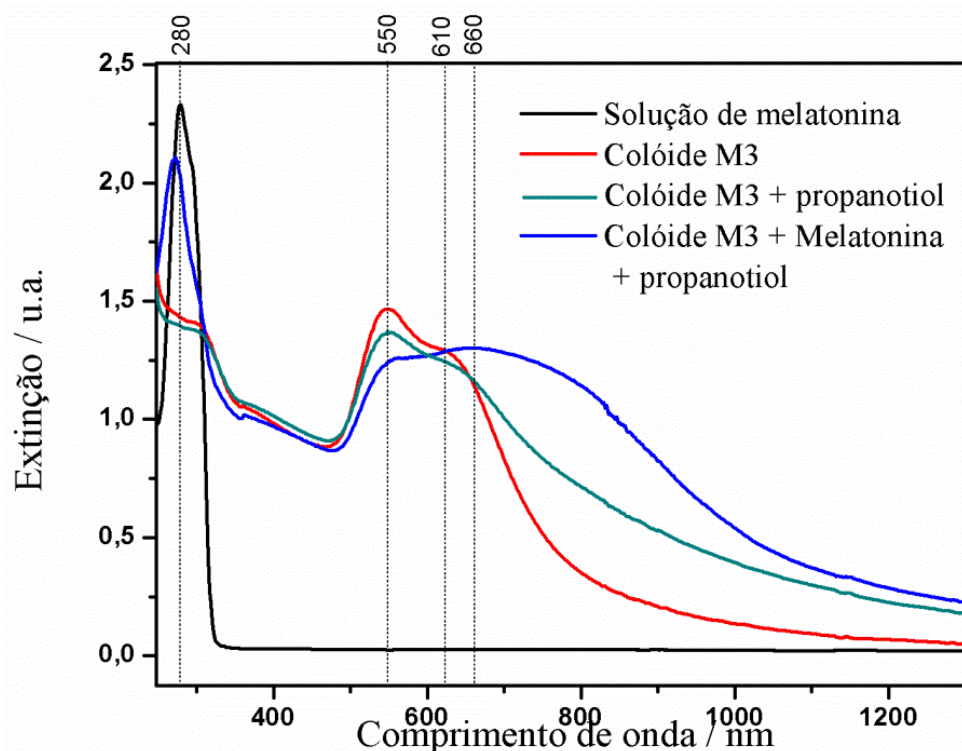
Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\rho$ : pêndulo (*rocking*);  $\tau$ : torção;  $\sigma$ : tesoura (*scissoring*); an: anel; assim: assimétrico; sim: simétrico.

A banda mais intensa do espectro SERS está em  $1044 \text{ cm}^{-1}$  e é atribuída aos estiramentos CN e CO do grupo amida. Este modo vibracional é aproximadamente perpendicular à superfície de ouro na geometria otimizada e, de acordo com as regras de seleção de superfície, justifica a grande intensidade observada. Esta banda também é intensa no espectro teórico devido à grande variação da polarizabilidade associada ao movimento. A banda em  $1164 \text{ cm}^{-1}$ , também intensa no espectro SERS, é atribuída à torção CH, e este modo vibracional também se encontra perpendicular à superfície, mas possui menor variação de polarizabilidade, sendo por isso uma banda fraca no espectro

teórico. As bandas em  $1424$  e  $1469\text{ cm}^{-1}$  são também intensas no espectro SERS, e bastante fracas no espectro teórico, e pela a atribuição destas bandas, deformação de ângulo CH e NH da amida e estiramento CC e CN do anel, respectivamente, são modos perpendiculares à superfície e o último envolve o sítio de adsorção. A banda referente ao estiramento CO da carboxila não aparece no espectro SERS, embora seja observada no espectro teórico, isto porque, de acordo com a geometria de adsorção, este modo é totalmente paralelo à superfície metálica.

#### 4.2.5 Melatonina

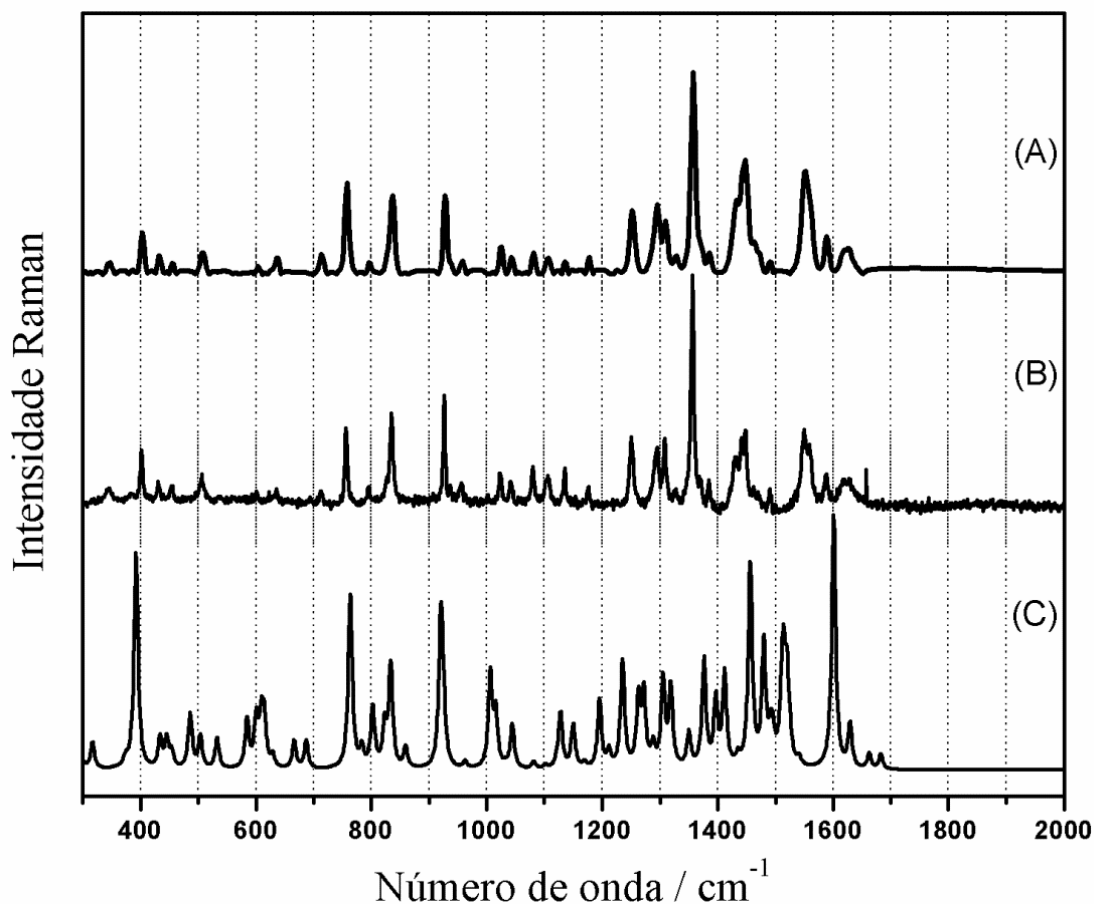
O espectro eletrônico da melatonina apresenta banda em  $280\text{ nm}$ , referente à transição  $\pi-\pi^*$  desta espécie (Crespo, Turjanski e Estrin, 2002). A Figura 47 apresenta o espectro eletrônico da melatonina, em adição aos espectros de extinção do colóide de ouro M3 na presença de melatonina e de um modificador de superfície (propanotiol).



**Figura 47:** Espectro eletrônico da solução aquosa de melatonina ( $1.10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$ ), espectro de extinção do colóide de ouro (M3) na ausência e presença de melatonina ( $1.10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ ) e propanotiol ( $2.10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$ ).

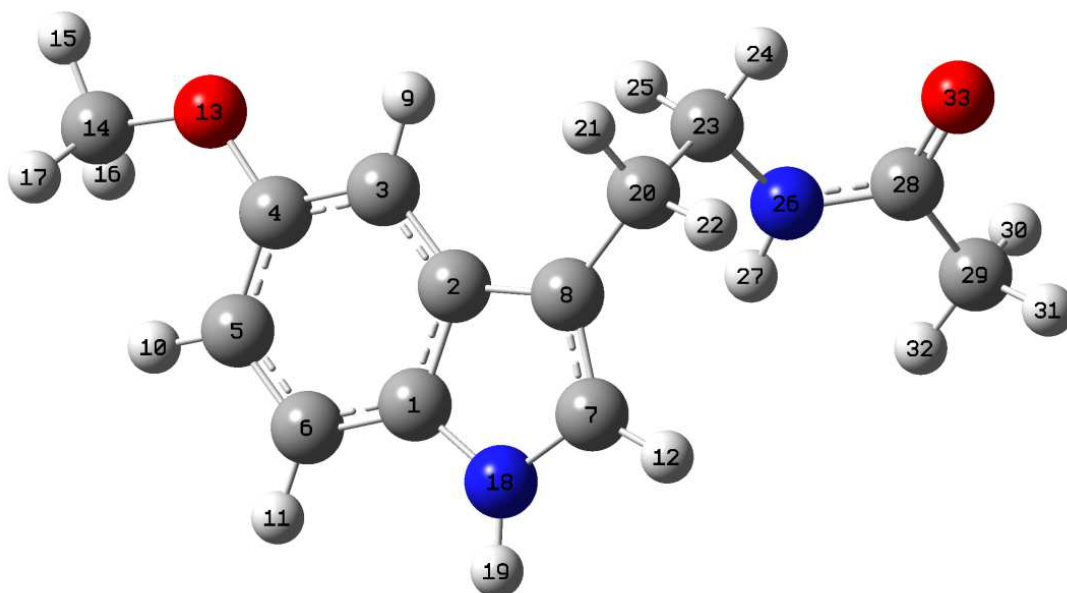
O propanotiol foi utilizado para a adsorção da melatonina. Sem a adição do mesmo o espectro de extinção do coloide não se alterou na presença da melatonina na concentração de  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Como se pode observar há uma forte interação entre o coloide e o adsorbato, quando o propanotiol está presente, já que o padrão espectral é bastante alterado. O máximo de extinção do coloide é deslocado para maiores comprimentos de onda – 550 nm para 660 nm – bem como há alargamento considerável da banda na direção do infravermelho próximo. O deslocamento do máximo da banda LSPR se deve a dois fatores: à adição de propanotiol e de melatonina – causando modificação do índice de refração do meio – e também ao aumento do tamanho das AuNPs.

A Figura 48 traz o espectro Raman da melatonina obtido com radiação excitante em 1064 nm e em 632,8 nm, adicionalmente é apresentado o espectro teórico obtido para esta molécula.



**Figura 48:** Espectro Raman da melatonina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A), 632,8 nm (B) e espectro teórico da melatonina(C).

O espectro Raman da melatonina obtido nas duas radiações de 1064 e 632,8 nm não apresentou diferenças consideráveis nos valores de intensidade relativa, evidenciando que o efeito de intensificação RR não é observado nestas radiações. A banda mais intensa do espectro experimental, em torno de  $1355\text{ cm}^{-1}$  não é observada com a mesma intensidade no espectro teórico, contudo as demais bandas estão em concordância. Como já dito anteriormente, essas diferenças são esperadas, uma vez no espectro teórico não são levados em conta interações intermoleculares, pois o cálculo é feito para uma espécie gasosa isolada. O valor de números de onda e a respectiva atribuição vibracional para as bandas dos espectros Raman da melatonina são apresentados na Tabela 11, e a estrutura otimizada para esta espécie, na Figura 49.



**Figura 49:** Estrutura otimizada para a Melatonina.

**Tabela 11:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para as bandas dos espectros Raman da melatonina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Calculado	Atribuição tentativa
Experimental			
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$	$\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$		
403	403	392	$\delta (\text{CC})_{\text{an}}$
758	758	763	$\delta (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}}$
835	835	833	$\gamma (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}}$
930	926	920	$\delta (\text{C}^5\text{C}^6\text{C}^4)$
1252	1252	1235	$\nu (\text{C}^4\text{O}^{13}) + \delta (\text{C}^3\text{H}) + \tau (\text{C}^{20}\text{H}_2)$
1296	1296	1305	$\nu (\text{C}^{28}\text{N}^{26}) + \delta (\text{C}^{23}\text{H}_2)$
1310	1310	1318	$\nu (\text{CN})_{\text{an}} + \omega (\text{C}^{20}\text{H}_2)$
1354	1357	1376	$\omega (\text{C}^{20}\text{H}_2) + \tau (\text{C}^{23}\text{H}_2)$
1445	1445	1456	$\nu (\text{C}^4\text{C}^5) + \delta (\text{N}^{18}\text{H})$
1553	1550	1601	$\nu (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}}$
1588	1588	1629	$\nu (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}}$
1618	1618	1662	$\nu (\text{C}^{28}\text{O}^{33})$
1628	1628	1682	$\nu (\text{CC})_{\text{an}}$

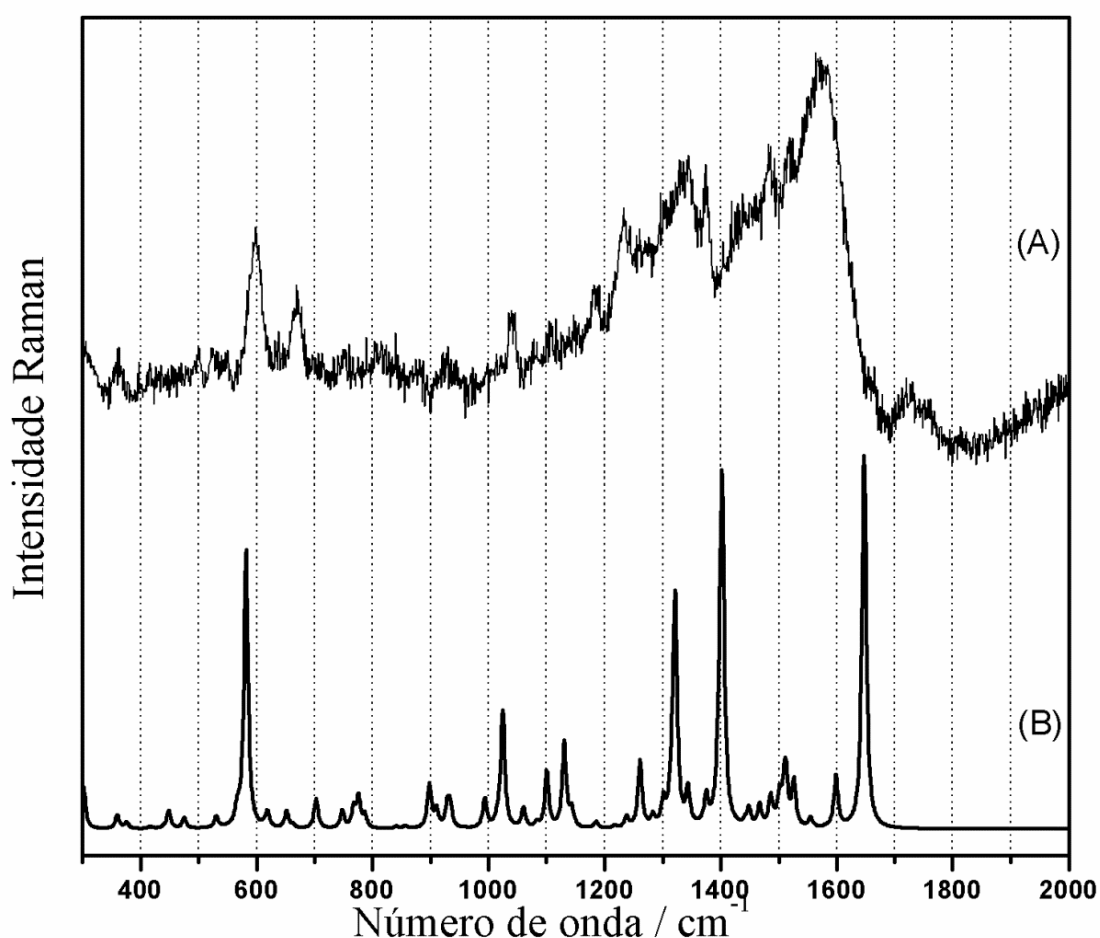
Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\omega$ : abano (*wagging*);  $\tau$ : torção (*twist*); an: anel.

A banda em  $1354 \text{ cm}^{-1}$  (1064 nm) e  $1357 \text{ cm}^{-1}$  (632,8 nm) intensa no espectro experimental e fraca no espectro teórico é atribuída à deformações angulares do  $\text{CH}_2$ . Devido ao grande número de bandas observadas no espectro teórico na região entre  $1200$  e  $1500 \text{ cm}^{-1}$ , utilizou-se como suporte o trabalho de Bayari e Ide (Bayari e Ide,



2003), o qual apresenta a atribuição dos modos vibracionais observados em espectros de absorção no infravermelho teórico e experimental.

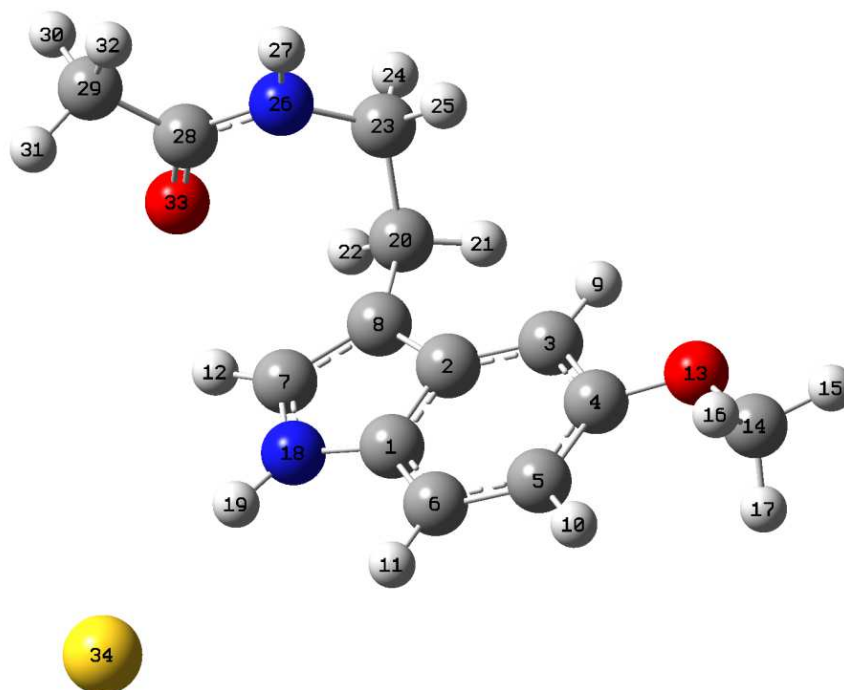
A melatonina possui forte potencial redutor (Mercolini, Mandrioli e Raggi, 2012), e sua interação com vários metais é bem descrita na literatura (Gulcin, Buyukokuroglu e Kufrevioglu, 2003). O espectro SERS desta espécie foi obtido em coloide de ouro (M3) na presença de um modificador de superfície, o propanotiol. O espectro SERS experimental e o espectro teórico da melatonina adsorvida em ouro são apresentados na Figura 50.



**Figura 50:** Espectro SERS da melatonina ( $1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em coloide de ouro (M3), na presença de propanotiol ( $2.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) com radiação excitante em 632,8 nm (A); espectro teórico do complexo de superfície formado entre a melatonina e o ouro (B).

A Figura 51 apresenta a geometria de adsorção da melatonina à superfície metálica, sendo que a configuração metálica mais adequada foi utilizando Au(I) com

spin tripleto. Com base nesta geometria foi realizada a atribuição dos modos vibracionais para as bandas do espectro SERS e esta se encontra na Tabela 12.



**Figura 51:** Estrutura otimizada para a melatonina adsorvida em superfície de ouro.

**Tabela 12:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas do espectro SERS da melatonina em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da melatonina adsorvida em superfície de ouro, e respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa
Experimental	Calculado	
$\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$		
597	582	$\delta (\text{N}^{26}\text{H})$
670	702	$\gamma (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}}$
1040	1024	$\delta (\text{C}^8\text{C}^7\text{N}^{18}) + \tau (\text{C}^{20}\text{H}_2 + \text{C}^{23}\text{H}_2)$
1234	1263	$\nu (\text{C}^4\text{O}^{13}) + \delta (\text{C}^3\text{H})$
1337	1322	$\nu (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}} + \omega (\text{C}^{20}\text{H}_2)$
1373	1402	$\nu (\text{CC} + \text{CN})_{\text{an}} + \omega (\text{C}^{23}\text{H}_2) + \tau (\text{C}^{20}\text{H}_2)$
1483	1511	$\sigma (\text{C}^{20}\text{H}_2 + \text{C}^{23}\text{H}_2)$
1519	1526	$\sigma (\text{C}^{20}\text{H}_2) + \delta (\text{C}^6\text{H} + \text{N}^{18}\text{H})$
1666	1647	$\nu (\text{C}^{28}\text{O}^{33} + \text{C}^6\text{C}^1)$

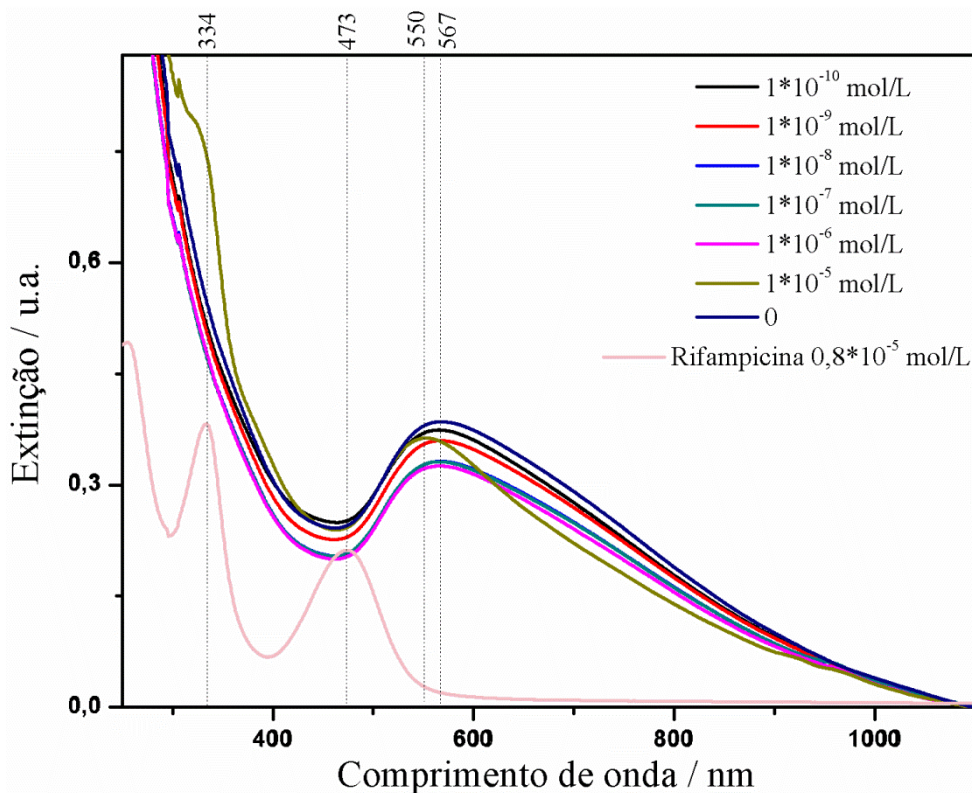
Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\omega$ : balanço (*wagging*);  $\eta$ : sombrinha;  $\sigma$ : tesoura;  $\tau$ : torção (*twist*); an: anel.

A banda mais intensa do espectro SERS em  $597 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação angular NH da amida, de acordo com a geometria otimizada, este modo vibracional é perpendicular à superfície. Outros modos intensificados são os que se referem às deformações angulares do  $\text{C}^{23}\text{H}_2$ , como em  $1373 \text{ cm}^{-1}$ , este modo também é perpendicular à superfície metálica, e por isso sofre intensificação. Os modos em  $1040$  e  $1337 \text{ cm}^{-1}$  são intensos por pertencerem ao sítio de adsorção, o nitrogênio do anel indólico. A banda em  $1647 \text{ cm}^{-1}$  no espectro teórico é bastante intensa, contudo no espectro SERS pode-se observar apenas a presença de um ombro em  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , esta

banda encontra-se encoberta pela banda larga e intensa nesta região, que pode ser atribuída a decomposição da matéria orgânica (carbono amorfo) (Kudelski e Pettinger, 2000). Possivelmente a função do propanotiol foi permitir interações de Van der Waals entre a porção propil do modificador e as regiões mais apolares da molécula, levando à aproximação do adsorbato, que permitiu a coordenação do grupo indol ao ouro.

#### **4.2.6 Rifampicina**

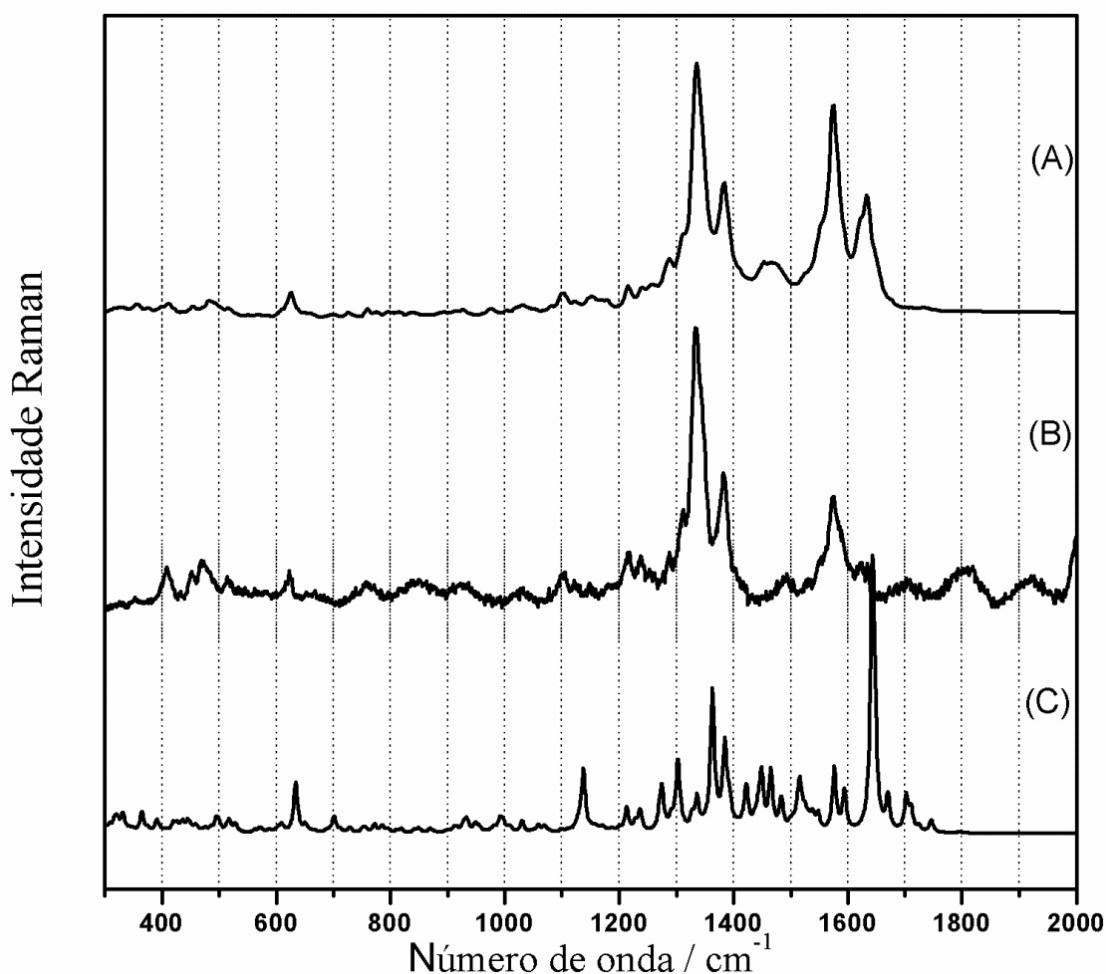
O espectro eletrônico da rifampicina varia consideravelmente com o valor do pH. Em pH neutro espera-se a presença de três bandas – 256, 334, 473 nm (Howes *et al.*, 2007). As duas primeiras bandas se referem a transição  $\pi-\pi^*$ , enquanto que a banda em 474 nm é associada à transição de transferência de carga  $\pi-\pi^*$  entre o grupamento CO do anel de cinco membros e o OH (Howes *et al.*, 2007). Através da espectroscopia LSPR foi possível a detecção da rifampicina, sendo que o limite de detecção para este adsorbato foi de  $1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. O espectro LSPR do coloide M1 na presença de diferentes concentrações de rifampicina é apresentado na Figura 52.



**Figura 52:** Espectros LSPR do colóide de ouro (M1) na presença de diferentes concentrações de solução aquosa de rifampicina, e espectro eletrônico da solução aquosa de rifampicina, com caminho óptico de um cm.

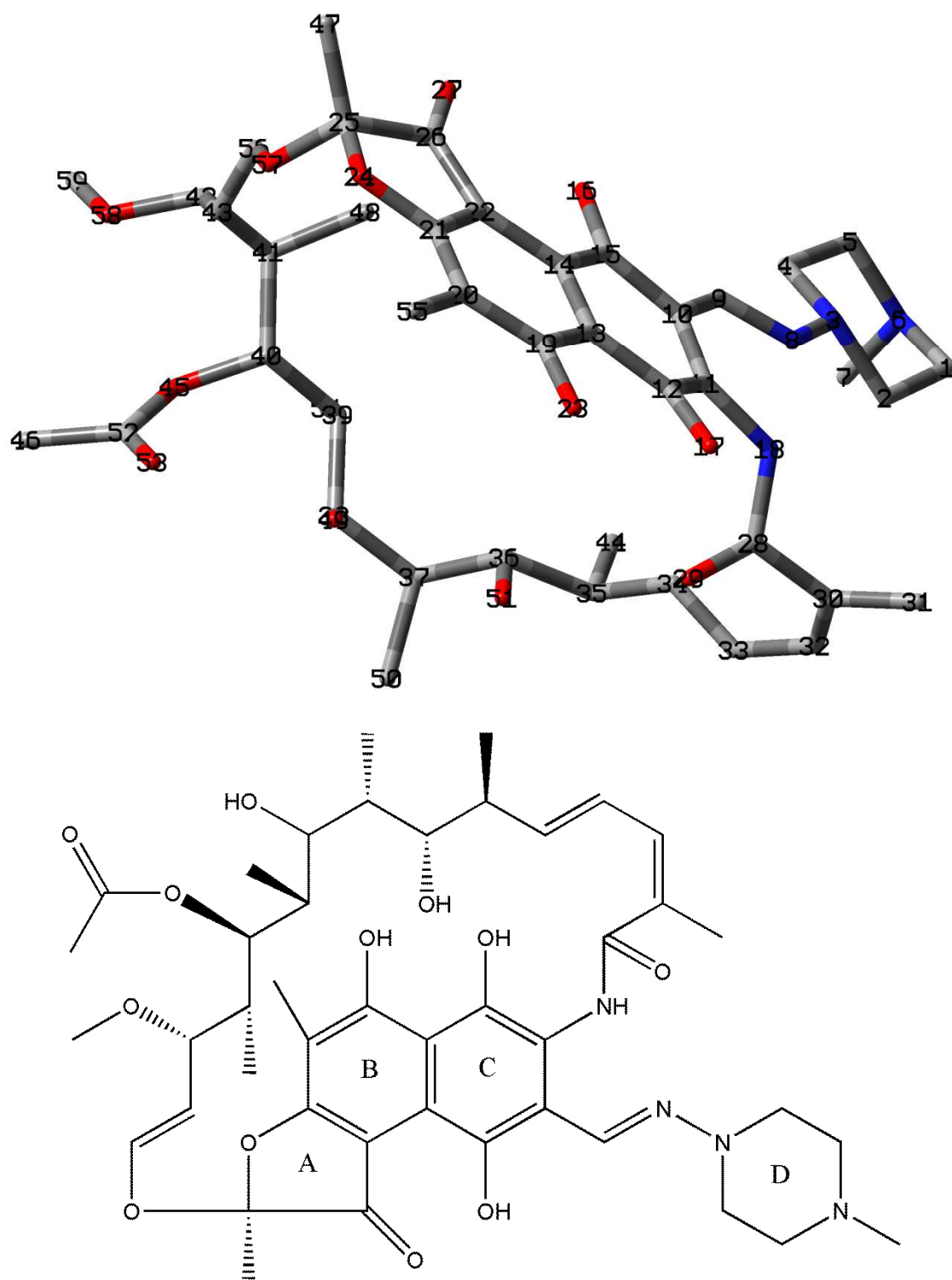
Como comentado anteriormente, a banda LSPR é bastante sensível ao índice de refração do meio. A adição de rifampicina, a partir da concentração de  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, causa mudanças na posição do máximo de extinção e também no formato da banda LSPR do colóide.

Na Figura 53 tem-se o espectro Raman experimental e teórico obtido para a rifampicina.



**Figura 53:** Espectro Raman da rifampicina sólida com radiação excitante em 1064 nm (A), 638,0 nm (B) e espectro teórico da rifampicina (C).

Não são observadas grandes diferenças entre os espectros nas radiações excitantes de 1064 nm e de 638,0 nm, pois nenhuma destas se encontra em ressonância com alguma das transições eletrônica da rifampicina. O espectro vibracional teórico da rifampicina ainda não foi reportado na literatura. No trabalho de Howes e colaboradores (Howes *et al.*, 2006) tem-se a atribuição vibracional da rifampicina a partir da comparação com a atribuição de espécie semelhantes. A estrutura otimizada obtida através do cálculo para a rifampicina é apresentada na Figura 54, e a Tabela 13 mostra os valores de número de onda para esta espécie nas diferentes linhas de excitação em comparação com os dados teóricos obtidos.



**Figura 54:** Estrutura otimizada para a rifampicina. Os átomos de hidrogênio foram omitidos por uma questão de clareza (acima). Fórmula estrutural da rifampicina (abaixo).

**Tabela 13:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas dos espectros Raman rifampicina sólida e do espectro teórico, e respectiva atribuição vibracional.

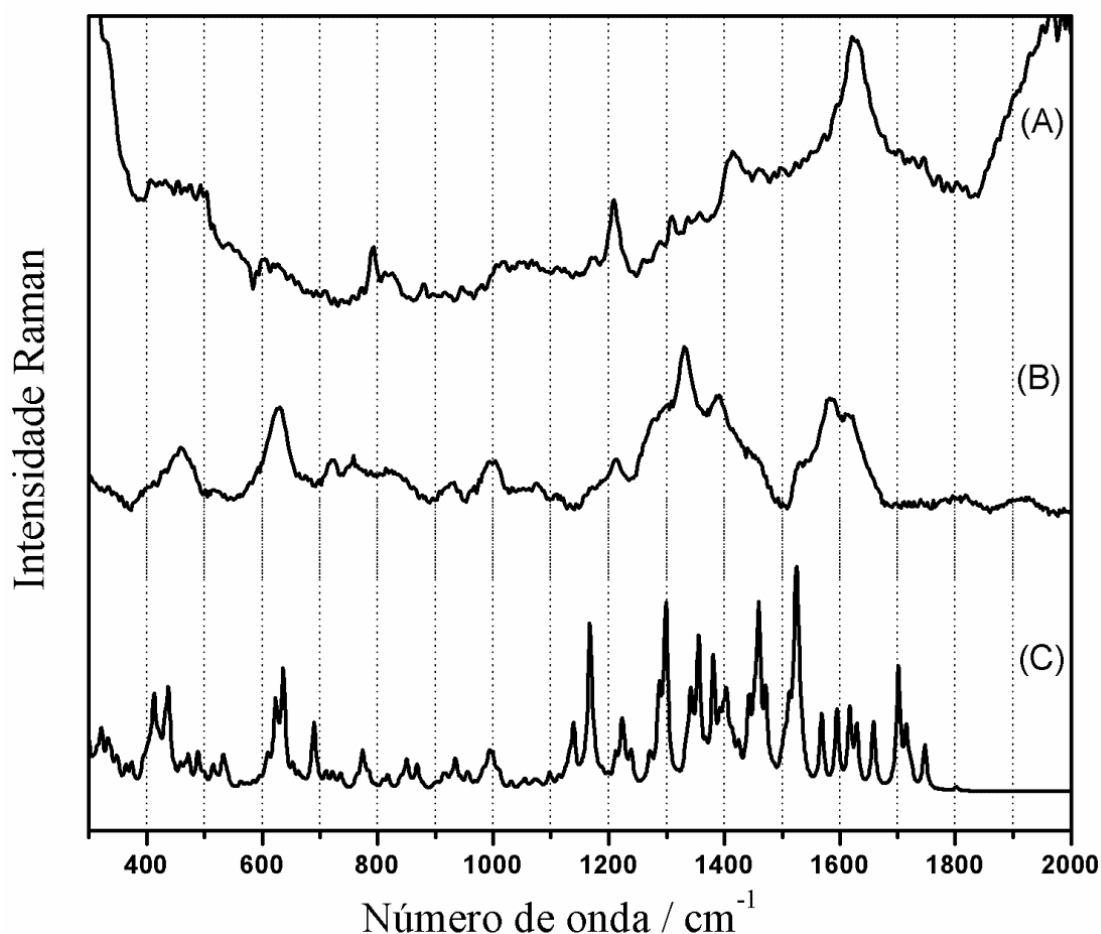
Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa	
Experimental		Calculado	
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$	$\lambda_0 = 638 \text{ nm}$		
625	623	634	$\gamma$ ( $\text{C}^{31}\text{C}^{30}\text{C}^{32}$ ) + esqueleto
1101	1102	1137	$\nu$ ( $\text{N}^3\text{N}^8$ ) + $\delta$ (anel B, C, D) + $\nu$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

Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\omega$ : abano (*wagging*);  $\eta$ : sombrinha (*umbrella*);  $\sigma$ : tesoura (*scissoring*);  $\rho$ : pêndulo (*rocking*);  $\tau$ : torção (*twist*).



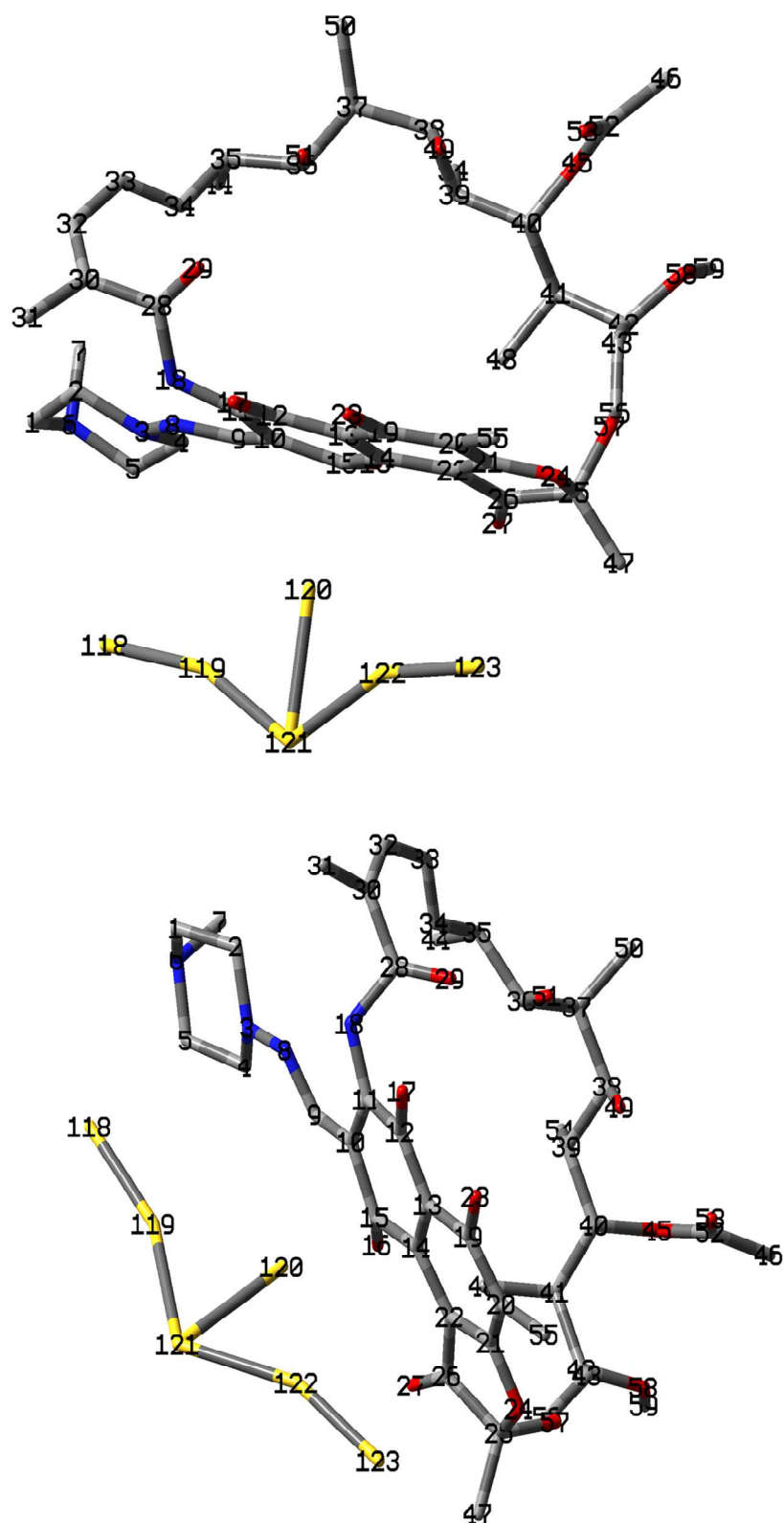
A rifampicina é uma molécula de complexidade estrutural elevada, dificultando a atribuição vibracional das bandas observadas, uma vez que vários modos normais envolvem vários grupos de átomos com vibrações acopladas. Apesar disso, há boa concordância entre os espectros experimentais e teórico. Através da comparação da atribuição vibracional obtida através do cálculo teórico com a atribuição comparativa reportada no trabalho de Howes e colaboradores (Howes *et al.*, 2007) observa-se que os resultados apresentam-se próximos.

Para a obtenção dos espectros SERS foram utilizadas duas radiações diferentes e também dois colóides de ouro distintos, um para cada radiação. Com radiação excitante em 1064 nm foi utilizado o colóide de ouro M1 e com radiação excitante em 638 nm, o colóide de ouro M3 com adição do modificador de superfície – 2-mercaptoetanol. Ambos os espectros são apresentados na Figura 55, juntamente com o espectro teórico obtido para a espécie adsorvida em superfície de ouro.



**Figura 55:** Espectro SERS da rifampicina ( $1.10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ) em coloide de ouro (M1) com radiação excitante em 1064 nm (A). Espectro SERS da rifampicina ( $1.10^{-3}$  mol.L $^{-1}$ ) em coloide de ouro (M3) na presença de 2-mercaptoetanol ( $2.10^{-6}$  mol.L $^{-1}$ ), com radiação excitante em 638 nm (com ajuste da linha base) (B). Espectro teórico do complexo formado entre a rifampicina e seis átomos de ouro (C).

A Figura 56 apresenta a estrutura otimizada para a rifampicina adsorvida em superfície de ouro. Para representar a superfície metálica foram utilizados seis átomos de ouro, uma vez que os dados obtidos quando apenas um átomo de ouro era utilizado não concordaram com o resultado experimental. A adsorção se dá pela aproximação dos quatro anéis da estrutura à superfície, com a menor distância prevalecendo entre os átomos Au $^{120}$  e C $^{15}$ . A Tabela 14 apresenta os valores de número de onda observados para as bandas dos espectros SERS da rifampicina, e a respectiva atribuição vibracional.



**Figura 56:** Estrutura otimizada para a rifampicina adsorvida em superfície de ouro apresentadas em duas perspectivas diferentes. Os átomos de hidrogênio foram omitidos por uma questão de clareza.

**Tabela 14:** Valores de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas do espectro SERS da rifampicina em coloide de ouro em comparação com o espectro Raman teórico da rifampicina adsorvida em superfície de ouro, e sua respectiva atribuição vibracional.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$		Atribuição tentativa	
Experimental		Calculado	
$\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$	$\lambda_0 = 638 \text{ nm}$		
-	462	439	$\delta$ (anel D)
-	626	636	$\gamma$ (anel B,C)
791	-	773	$\gamma$ (anel A, B) + resp. (anel D)
-	999	999	$\delta$ (anel A, B, C, D)
1208	1215	1167	$\omega$ ( $\text{C}^7\text{H}_3$ )
1311	1332	1299	$\nu$ (CC (anel A, B, C)) + $\delta$ ( $\text{O}^{23}\text{H} + \text{C}^{43}\text{H}$ )
1414	1391	1404	$\nu$ (CC (anel B, C) + $\text{C}^{21}\text{O}^{24}$ ) + $\delta$ ( $\text{O}^{16}\text{H} + \text{O}^{17}\text{H}$ )
1461	1461 (sh)	1459	$\nu$ (CC (anel B,C) + $\text{C}^{12}\text{O}^{17}$ ) + $\delta$ ( $\text{O}^{23}\text{H}$ ) + $\eta$ ( $\text{C}^{55}\text{H}_3$ )
-	1531 (sh)	1525	$\nu$ (CC(anel A, B, C)) + $\sigma$ ( $\text{C}^{31}\text{H}_3 + \text{C}^{48}\text{H}_3$ ) + $\delta$ ( $\text{O}^{16}\text{H}$ )
1593 (sh)	1582	1617	$\nu$ ( $\text{C}^9\text{N}^8 + \text{CC}(\text{anel B, C})$ ) + $\delta$ ( $\text{C}^9\text{H} + \text{O}^{17}\text{H}$ )
1625	1615	1658	$\nu$ (CC (anel B)) + $\delta$ ( $\text{O}^{17}\text{H} + \text{O}^{23}\text{H}$ )

Abreviaturas:  $\delta$ : deformação angular no plano;  $\gamma$ : deformação angular fora do plano;  $\nu$ : estiramento;  $\eta$ : sombrinha (*umbrella*);  $\sigma$ : tesoura (*scissoring*);  $\rho$ : pêndulo (*rocking*); sh: ombro; resp: respiração.

Os espectros SERS da rifampicina obtidos com e sem modificador de superfície, são um pouco diferentes, no entanto há coincidência entre algumas bandas, tais como 1208, 1311, 1414 e 1625  $\text{cm}^{-1}$ , no espectro em 1064 nm sem 2-mercaptoetanol, correspondendo à 1215, 1332, 1391 e 1622  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, no espectro em 638

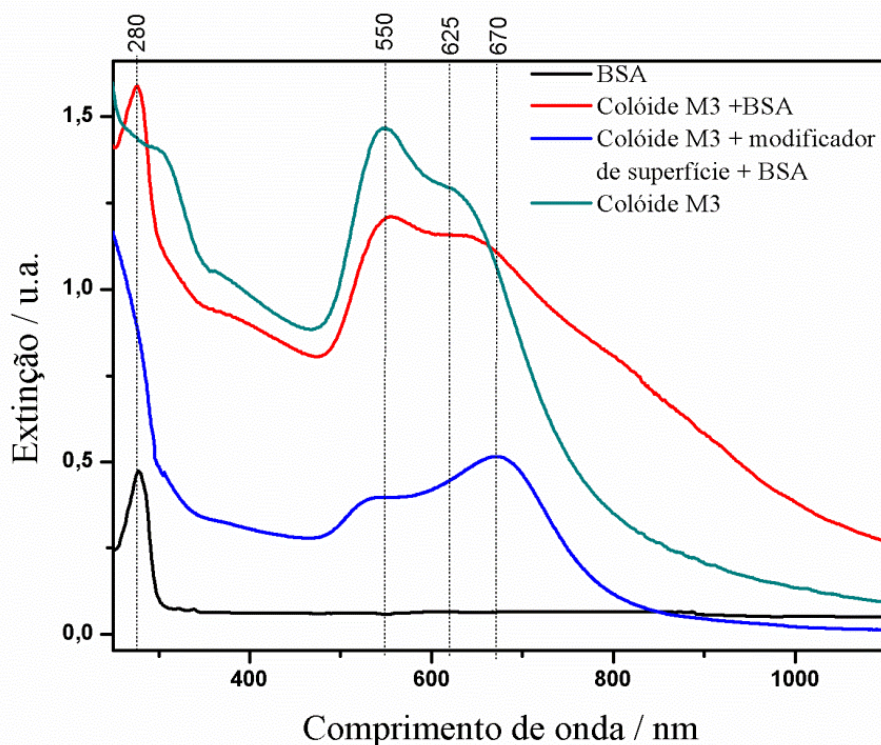
nm com 2-mercaptoetanol. As diferenças observadas nos valores de número de onda e de intensidades relativas se devem principalmente à presença do modificador de superfície. É importante ressaltar que no espectro obtido com radiação excitante em 638 nm, as bandas SERS estão sobrepostas a duas bandas largas em *ca.* 1300 e 1600  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas à presença de carbono amorfo na superfície (Kudelski e Pettinger, 2000). Ambos os espectros concordam com os cálculos teóricos obtidos, uma vez que todas as bandas presentes nos espectros experimentais são também encontradas no espectro teórico. Os espectros RR e SERRS da rifampicina foram recentemente reportados na literatura (Howes *et al.*, 2006), sendo a radiação excitante utilizada em 514,5 nm, e os dados reportados corroboram os aqui apresentados.

No espectro SERS com radiação excitante em 1064 nm as bandas mais intensas, 1208 e 1625  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas respectivamente a deformação angular C-H e principalmente ao estiramento CC do anel B. A estrutura otimizada, apresentada na Figura 56, permite sugerir que como o C<sup>15</sup> do anel B está mais próximo da superfície do metal a interação se dá por atração eletrostática entre o átomo de ouro e os elétrons  $\pi$  do sistema aromático. No espectro SERS obtido com radiação excitante em 638 nm, na presença de 2-mercaptoetanol, as bandas intensificadas em 462 e 1582  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas às vibrações envolvendo o anel D e o C<sup>9</sup>N<sup>8</sup>, respectivamente. Pode-se deduzir que essa região da molécula está envolvida na adsorção por maior proximidade com a superfície metálica. Além disso, a intensificação das bandas em 626, 1332 e 1582  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a modos normais envolvendo estiramento de ligações CC dos anéis B e C, permite inferir que ligações de hidrogênio envolvendo a hidroxila do modificador de superfície e os grupos amina e hidroxila do adsorbato, levam a uma maior proximidade entre a rifampicina e a superfície metálica. A presença do 2-mercaptoetanol, possivelmente, levou a uma geometria de adsorção próxima ao modelo utilizado.

Adicionalmente, a banda em 791  $\text{cm}^{-1}$  presente no espectro da Figura 55A, e a banda em 626  $\text{cm}^{-1}$  na Figura 55B, são atribuídas aos modos de vibração fora do plano envolvendo o anel B. Isto leva a crer, baseado nas regras de seleção de superfície, que os anéis A, B e C se encontram aproximadamente paralelos à superfície metálica.

#### 4.2.7 Albumina Sérica Bovina

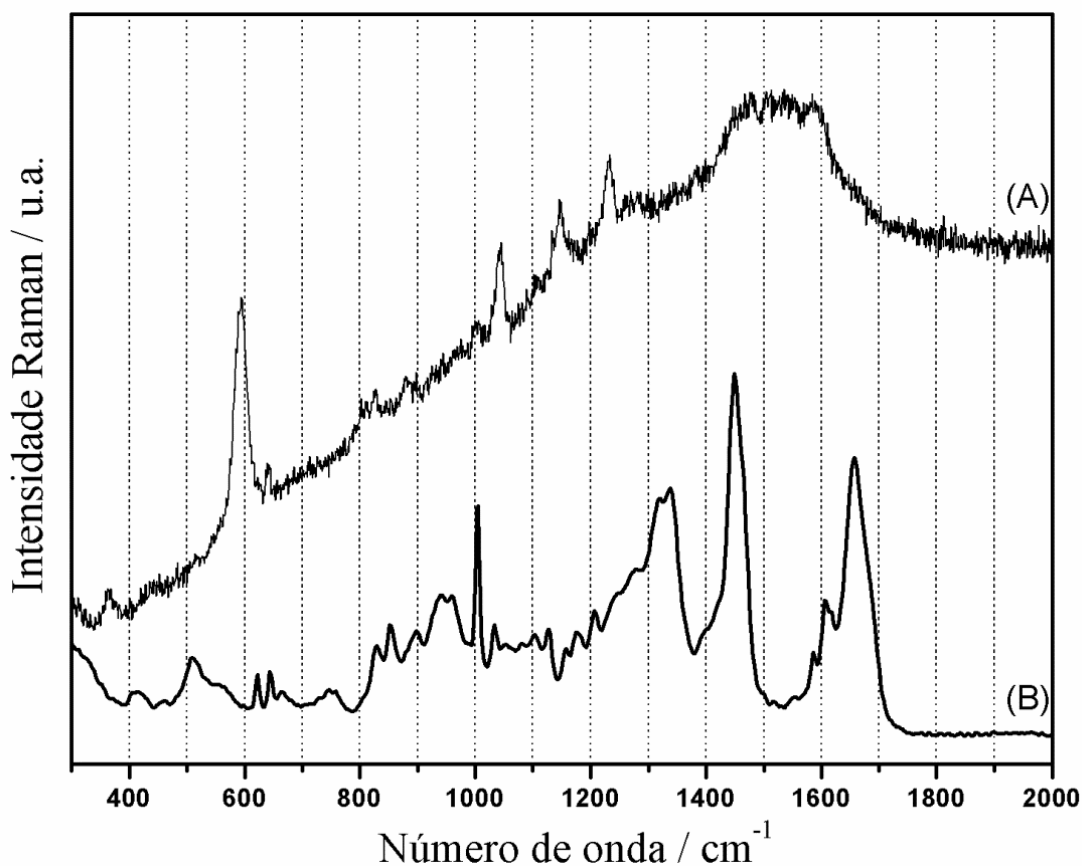
O espectro eletrônico da solução aquosa de BSA exibe máximo de absorvância em 280 nm devido aos resíduos aromáticos de tirosina e triptofano (Iosin *et al.*, 2009). O espectro eletrônico da BSA, juntamente com espectro de extinção do colóide M3 na presença e ausência de BSA e de um modificador de superfície (2-mercaptoetanol) é apresentado na Figura 57.



**Figura 57:** Espectro de eletrônico de solução aquosa de BSA ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ); espectro de extinção do colóide M3 na ausência e na presença de solução aquosa 2-mercaptoetanol ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) e de BSA ( $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ).

O colóide M3 na presença somente de BSA sofreu agregação, observada pela diminuição da banda LSPR na região de 550 nm, e conseqüente alargamento e aumento da intensidade no infravermelho próximo. Quando o 2-mercaptoetanol é adicionado previamente a este sistema o máximo da banda LSPR é deslocado para 670 nm, sendo observada a presença de um ombro em 540 nm, semelhante ao observado no experimento com a adrenalina apresentado na Figura 29. A menor largura da banda LSPR indica que a agregação leva a uma menor distribuição de tamanhos, mesmo após a adição da BSA.

O espectro SERS é apresentado na Figura 58, juntamente com o espectro Raman do BSA sólido na radiação de 1064 nm. O espectro SERS do BSA foi obtido com radiação excitante em 632,8 nm na presença de um modificador de superfície, o propanotiol, pois nesta condição a ressonância foi otimizada (Figura 57). O espectro Raman com radiação excitante em 632,8 nm não foi obtido, contudo este é apresentada no trabalho de Iosin e colaboradores (Iosin *et al.*, 2009). Ao comparar o espectro Raman deste trabalho com o espectro obtido com radiação excitante em 1064 nm, não há divergências significativa de intensidade relativa, bem como na posição das bandas.



**Figura 58:** Espectro SERS da BSA ( $1.10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ) em colóide de ouro M3, na presença de propanotiol ( $2.10^{-5}$  mol.L $^{-1}$ ) com radiação excitante em 632,8 nm (A); espectro Raman da BSA sólida com radiação excitante em 1064 nm.

Como se pode observar algumas bandas presentes no espectro Raman, são também encontradas no espectro. Isto pode estar associado à conformação em que a BSA se encontra em solução aquosa, pois a carga superficial da proteína depende diretamente da conformação, e essa apresenta tanto sítios carregados negativamente –

ácidos glutamínico e aspártico – quanto positivamente – lisina e histidina (Iosin *et al.*, 2009).

A BSA é uma proteína complexa, e por esse motivo a determinação do sítio de adsorção torna-se difícil. Embora seja conhecido que a BSA apresenta um tiol na posição 34 do resíduo de cisteína e 17 pontes dissulfeto (Iosin *et al.*, 2009), as quais desempenham importante papel na adsorção. Para a atribuição das principais bandas do espectro Raman e SERS da BSA foram utilizados como base os trabalhos de Iosin e colaboradores (Iosin *et al.*, 2009; Iosin, Canpean e Astilean, 2011).

No espectro Raman a banda referente ao estiramento da ponte dissulfeto é observada em  $515\text{ cm}^{-1}$  e a banda intensa localizada em  $1003\text{ cm}^{-1}$ , acompanhada da banda em  $1033\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas respectivamente à deformação angular  $\text{NH}_2$  e ao estiramentos CC do anel aromático do resíduo de fenilalanina (Polfer *et al.*, 2005). As bandas presentes na região de  $1200\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$  se referem as combinações dos modos de deformação angular NH e estiramento CC. E as bandas na região entre  $1440\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$  são associadas à deformação angular  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  dos diferentes resíduos de aminoácidos presentes na estrutura. A banda intensa em  $1659\text{ cm}^{-1}$  no espectro Raman é característica do estiramento C=O, e também da estrutura em  $\alpha$ -hélice da albumina.

A banda mais intensa do espectro SERS se encontra em  $590\text{ cm}^{-1}$  e pode ser atribuída ao estiramento C-S da ponte dissulfeto. Para esclarecer se essa banda se devia ao modificador de superfície utilizado para obtenção do espectro, fez-se um espectro das AuNPs na presença do propanotiol apenas, e nenhuma banda foi observada, evidenciando que o espectro SERS obtido se deve somente à BSA. A banda localizada em  $1044\text{ cm}^{-1}$  no espectro SERS pode estar associada ao resíduo de fenilalanina. E a banda em  $1234\text{ cm}^{-1}$ , se refere ao resíduo de triptofano – no espectro Raman a banda referente a este modo é encontrada em  $1214\text{ cm}^{-1}$ . A partir da atribuição comparativa das bandas intensificadas no espectro SERS, pode-se dizer que a BSA não adsorve sobre as AuNPs por apenas um sítio. Isto era esperado, devido à complexidade da proteína – uma estrutura grande e que com a adsorção não sofre significativas mudanças conformacionais (Iosin *et al.*, 2009). Além disso, as interações intermoleculares do tipo Van der Waals formadas entre o propanotiol e a BSA facilitam o ancoramento desta espécie à superfície metálica.



## **5- CONCLUSÃO**

Foram sintetizados seis coloides de ouro, variando-se a proporção molar dos reagentes, a concentração dos mesmos e a temperatura na qual as sínteses foram feitas. Estas sínteses não estão relatadas na literatura. Pôde-se observar a grande influência que esses parâmetros possuem sobre a distribuição de tamanhos das NPs, bem como sobre o formato da banda LSPR dos coloides. Investigou-se o processo de envelhecimento do colóide M1, evidenciando a cinética de reconstrução que continua ocorrendo mesmo após 12 dias da síntese.

A influência da proporção molar dos reagentes no tamanho das NPs foi estudada pela comparação entre os espectros obtidos para os coloides M3, M4 e M5. Pôde-se concluir que quanto menor a concentração final de ouro, menor também o tamanho das NPs, bem como mais estreita a distribuição de tamanhos. Conforme a quantidade do sal precursor foi aumentada houve deslocamento do máximo de extinção do espectro LSPR na direção do infravermelho próximo, e também alargamento considerável desta banda, indicando maior distribuição de tamanho.

Comparou-se, ainda, o efeito das NPs nucleadoras no tamanho das AuNPs. As AuNPs sintetizadas com o uso de NPs nucleadoras de sílica recobertas com prata (colóide M6) apresentaram maior tamanho do que as NPs sintetizadas com o uso de NPs nucleadoras de prata (colóide M1). Além de apresentarem maior tamanho, as AuNPs do colóide M6 também possuíam maior distribuição de tamanhos, uma vez que a banda LSPR apresentou largura apreciável.

As CuNPs foram sintetizadas seguindo o procedimento proposto por Coyle e colaboradores (Coyle, Chumanov e Jagodzinski, 1998). Pôde-se comprovar por espectroscopia eletrônica a formação de uma fina camada de óxido de cobre (II) sobre a superfície destas NPs, que permitiu inferir que houve a formação de um sistema caroço-casca Cu@CuO. Estas NPs foram utilizadas para obtenção do espectro SERS da espécie p-fenilenodiamina, que atuou como redutora do óxido de cobre (II). A cinética desta reação redox foi acompanhada por espectroscopia eletrônica e foi verificada que a transição interna do cobre (II) dá lugar à banda LSPR das CuNPs. Cálculos foram efetuados para a p-fenilenodiamina livre e para a espécie oxidada complexada com o metal. Os dados obtidos, através do modelo de adsorção proposto, levaram à atribuição

vibracional dos espectros obtidos experimentalmente, que corroboraram a hipótese de oxidação da espécie p-fenilenodiamina adsorvida, e a redução da camada de óxido.

A partir das várias sínteses dos colóides pôde-se determinar a grande influência exercida sobre cada um dos parâmetros no tamanho e na forma das nanopartículas. Estes fatores são, portanto determinantes para obtenção da ressonância entre as nanopartículas e a radiação excitante. O tamanho e a forma das nanopartículas de ouro e cobre foi determinado pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Estudou-se a adsorção da serotonina em superfície de ouro na presença do ácido mercaptopropanóico. O processo de adsorção conduziu a uma agregação controlada que permitiu a obtenção do espectro SERS com a radiação excitante em 1064 nm. Foi realizada a atribuição vibracional das principais bandas do espectro SERS da serotonina a partir de cálculos teóricos dos modos vibracionais, que permitiu propor que a adsorção ocorreu através da interação do átomo de nitrogênio do anel indólico com um átomo de ouro. O papel do ácido mercaptopropanóico foi apenas permitir interações de hidrogênio com a molécula, facilitando sua aproximação com a superfície metálica.

O espectro SERS da adrenalina adsorvida sobre superfície de ouro foi obtido na presença e ausência do propanotiol. Os dois padrões espectrais se mostraram distintos. Foi proposto que o espectro SERS obtido da adrenalina, quando foi utilizado o propanotiol, era da espécie não oxidada, por comparação com o espectro Raman da espécie livre, e o obtido na ausência do modificador de superfície era da espécie oxidada, pois a presença desta foi determinada em solução aquosa. A atribuição dos espectros, baseada em cálculos teóricos dos modos normais de vibração, permitiu supor que a adrenalina não oxidada adsorveu pelo átomo de nitrogênio da amina e, quando oxidada, adsorveu pelos átomos de oxigênio das carbonilas presentes no anel.

O espectro SERS da L-carnosina adsorvida sobre superfície de ouro foi obtido sem adição de nenhum modificador de superfície. A L-carnosina apresentou forte interação química com a superfície de ouro, conduzindo a uma agregação controlada das nanopartículas metálicas, que permitiu a obtenção do espectro SERS com a radiação excitante em 1064 nm. A atribuição dos espectros baseada nos cálculos dos modos vibracionais permitiu supor que a adsorção ocorreu pela interação do átomo de nitrogênio do anel imidazólico com a superfície metálica.

O espectro SERS da melatonina adsorvida sobre superfície de ouro foi obtido utilizando-se propanotiol como modificador de superfície. Não foi possível obter-se o espectro SERS deste composto sem um modificador de superfície, possivelmente pela pequena afinidade deste adsorbato pela superfície de ouro. A atribuição do espectro SERS da melatonina, baseada nos cálculos dos modos normais de vibração permitiu supor que a adsorção ocorreu pela interação do átomo de nitrogênio do anel indólico com a superfície metálica.

Os espectros SERS da rifampicina adsorvida sobre superfície de ouro foram obtidos na presença e ausência do mercaptoetanol. Dois padrões espectrais distintos foram obtidos, mas várias bandas estavam presentes em ambos. Baseado na atribuição do espectro SERS suportado por cálculos teóricos dos modos normais de vibração, propôs-se que a interação se deu entre um átomo de ouro da superfície e um átomo de carbono dos anéis aromáticos, possivelmente por atração eletrostática do metal com elétrons  $\pi$ . A geometria otimizada para o complexo de superfície formado entre a rifampicina e a superfície de ouro, consistiu em representar a superfície metálica por seis átomos de ouro, tendo os anéis presentes na molécula paralelos à superfície. O papel proposto para o mercaptoetanol foi o ancoramento da molécula na superfície metálica por interações de hidrogênio envolvendo a hidroxila do modificador de superfície e os átomos de nitrogênio do anel D, bem como os átomos de oxigênio do anel A.

O espectro SERS da BSA foi obtido na presença de propanotiol como modificador de superfície. O BSA é uma proteína de complexidade elevada, e por isso a atribuição vibracional desta espécie foi feita com base em dados reportados na literatura. A partir disto, pôde-se concluir que a adsorção da proteína ao metal não ocorreu por apenas um sítio, uma vez que modos vibracionais referentes a diferentes grupos funcionais foram intensificados. Propôs-se que a adsorção ocorreu pelas pontes dissulfeto, resíduos de fenilalanina e triptofano presentes na estrutura, sendo que o adsorbato foi ancorado à superfície metálica pelas ligações intermoleculares de Van der Waals com o propanotiol.

Para todos os adsorbatos estudados por SERS foram obtidos os espectros Raman dos materiais sólidos e realizados os cálculos teóricos dos modos normais de vibração da molécula isolada para a realização da atribuição destes espectros. Os resultados

obtidos permitiram a realização da atribuição dos espectros SERS destes adsorbatos com maior confiabilidade.

## **6- REFERÊNCIAS**

- AGUIAR, H. B. et al. Surface enhanced Raman spectroscopy analysis of the adsorption of 2-thiouracil to Au, Ag and Cu electrodes: Surface potential dependence. **Vibrational Spectroscopy**, 2006. v. 40, n. 1, p. 127-132.
- AKALIN, E.; AKYÜZ, S. Theoretical study of IR spectra of paraphenylenediamine. **Vibrational Spectroscopy**, 2000. v. 22, n. 1-2, p. 3-10.
- \_\_\_\_\_. Experimental and theoretical study of the vibrational spectra of paraphenylenediamine transition metal (II) complexes. **Journal of Molecular Structure**, 2001. v. 563-564, n. 0, p. 579-586.
- ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalously 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.
- ANDRADE, G. F. S. **Adsorção molecular em metais de transição (ferro, cobalto e níquel) monitorada pela técnica de espalhamento Raman intensificado pela superfície: diferentes tipos de substratos metálicos**. 2007. 129 (Doutorado). Departamento de Química, USP, São Paulo.
- AROCA, R. **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**. LTD, J. W. S. 2006.
- ARTUR, C. G. et al. Single-molecule SERS detection of C-60. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2012. v. 14, n. 9, p. 3219-3225.
- AYDIN, A. et al. The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. **Biogerontology**, 2010. v. 11, n. 1, p. 103-109.
- BAILEY, S. E.; ZINK, J. I.; NELSEN, S. F. Contributions of symmetric and asymmetric normal coordinates to the intervalence electronic absorption and resonance Raman spectra of a strongly coupled p-phenylenediamine radical cation. **Journal of the American Chemical Society**, May 14 2003. v. 125, n. 19, p. 5939-5947.
- BASTUS, N. G.; COMENGE, J.; PUNTES, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. **Langmuir**, Sep 2011. v. 27, n. 17, p. 11098-11105.
- BAYARI, S.; IDE, S. Fourier transform infrared spectra and molecular structure of 5-methoxytryptamine, N-acetyl-5-methoxytryptamine and N-phenylsulfonamide-5-methoxytryptamine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2003. v. 59, n. 6, p. 1255-1263.
- BAYARI, S.; SAGLAM, S.; USTUNDAG, H. F. Experimental and theoretical studies of the vibrational spectrum of 5-hydroxytryptamine. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, 2005. v. 726, n. 1-3, p. 225-232.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, 1993. v. 98, n. 7, p. 5648-5652.

- BELLIA, F.; VECCHIO, G.; RIZZARELLI, E. Carnosine derivatives: new multifunctional drug-like molecules. **Amino Acids**, 2012. v. 43, n. 1, p. 153-163.
- BOLDYREV, A. Carnosine: New concept for the function of an old molecule. **Biochemistry (Moscow)**, 2012. v. 77, n. 4, p. 313-326.
- BRANHAM, M. L. et al. Preparation, Spectrochemical, and Computational Analysis of L-Carnosine (2-[(3-Aminopropanoyl)amino]-3-(1H-imidazol-5-yl)propanoic Acid) and Its Ruthenium (II) Coordination Complexes in Aqueous Solution. **Molecules**, 2011. v. 16, n. 12, p. 10269-10291.
- BREZA, M.; KORTIŠOVÁ, I.; CIBULKOVÁ, Z. DFT study of the reaction sites of N,N'-substituted p-phenylenediamine antioxidants. **Polymer Degradation and Stability**, 2006. v. 91, n. 12, p. 2848-2852.
- CÁRCAMO, J. J. et al. Proline and hydroxyproline deposited on silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study. **Journal of Raman Spectroscopy**, 2012. v. 43, n. 6, p. 750-755.
- CARPENTIERI, A. et al. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, 2012. v. 65, n. 4, p. 437-444.
- CASTILLO, F.; DE LA ROSA, E.; PEREZ, E. Gold aggregates on silica templates and decorated silica arrays for SERS applications. **European Physical Journal D**, Jul 2011. v. 63, n. 2, p. 301-306.
- CHATTOPADHYAY, A.; RUKMINI, R.; MUKHERJEE, S. Photophysics of a neurotransmitter: Ionization and spectroscopic properties of serotonin. **Biophysical Journal**, Oct 1996. v. 71, n. 4, p. 1952-1960.
- CHEN, L. et al. Zincon as resonance Raman probe for quantitative evaluation of proteins. **Journal of Raman Spectroscopy**, Nov 2011. v. 42, n. 11, p. 1963-1966.
- CHEN, S.-M.; PENG, K.-T. The electrochemical properties of dopamine, epinephrine, norepinephrine, and their electrocatalytic reactions on cobalt(II) hexacyanoferrate films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 2003. v. 547, n. 2, p. 179-189.
- CHIPMAN, D. M.; SUN, Q.; TRIPATHI, G. N. R. **Para phenylenediamine radical cation structure studied by resonance Raman and molecular orbital methods**. AIP, 1992. 8073-8085 p.
- CHUNG, T. et al. Plasmonic Nanostructures for Nano-Scale Bio-Sensing. **Sensors**, 2011. v. 11, n. 11, p. 10907-10929.
- COLLIER, W. B.; MAGDO, I.; KLOTS, T. D. Infrared and Raman spectra of bicyclic molecules using scaled noncorrelated and correlated ab initio force fields. **Journal of Chemical Physics**, Mar 22 1999. v. 110, n. 12, p. 5710-5720.
- COMBS, Z. A. et al. Label-Free Raman Mapping of Surface Distribution of Protein A and IgG Biomolecules. **Langmuir**, 2011/03/15 2011. v. 27, n. 6, p. 3198-3205.

COYLE, C. M.; CHUMANOV, G.; JAGODZINSKI, P. W. Surface-enhanced Raman spectra of the reduction product of 4-cyanopyridine on copper colloids. **Journal of Raman Spectroscopy**, 1998. v. 29, n. 8, p. 757-762.

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.

CRESPO, A.; TURJANSKI, A. G.; ESTRIN, D. O. A. Electronic spectra of indolyl radicals: a time-dependent DFT study. **Chemical Physics Letters**, 2002. v. 365, n. 1-2, p. 15-21.

CURVALE, R.; DEBATTISTA, N.; PAPPANO, N. Interaction Between 2',4-Dihydroxychalcone and the N, F, E Conformers of Bovine Serum Albumin: Influence of Temperature and Ionic Strength. **The Protein Journal**, 2012. v. 31, n. 4, p. 293-299.

DE FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A.; SALA, O. Vinte Anos de Efeito SERS. **Química Nova**, 1999. v. 22, n. 4, p. 12.

DECKER, E. A.; CRUM, A. D.; CALVERT, J. T. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1992/05/01 1992. v. 40, n. 5, p. 756-759.

DIAN, B. C. et al. Infrared-induced conformational isomerization and vibrational relaxation dynamics in melatonin and 5-methoxy-N-acetyl tryptophan methyl amide. **Journal of Chemical Physics**, May 15 2004. v. 120, n. 19, p. 9033-9046.

DIEZ, R. P.; BARAN, E. J. A density functional study of some physical properties of carnosine (N-beta-alanyl-L-histidine). **Journal of Molecular Structure-Theochem**, Feb 28 2003. v. 621, n. 3, p. 245-251.

DIJKSTRA, R. J. et al. Monitoring neurotransmitter release using surface-enhanced Raman spectroscopy. **Journal of Neuroscience Methods**, 2007. v. 159, n. 1, p. 43-50.

DIXIT, P. et al. Evaluation of nitrate reduction assay, resazurin microtiter assay and microscopic observation drug susceptibility assay for first line antitubercular drug susceptibility testing of clinical isolates of M. tuberculosis. **Journal of Microbiological Methods**, 2012. v. 88, n. 1, p. 122-126.

DONG, S. et al. Simultaneous determination of dihydroxybenzene and phenylenediamine positional isomers using capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection. **Journal of Separation Science**, Sep 2009. v. 32, n. 18, p. 3232-3238.

\_\_\_\_\_. Simultaneous determination of phenylenediamine isomers and dihydroxybenzene isomers in hair dyes by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, May 2008. v. 391, n. 2, p. 653-659.

DOUKETIS, C. et al. Self-affine silver films and surface-enhanced Raman scattering: Linking spectroscopy to morphology. **The Journal of Chemical Physics**, 2000. v. 113, n. 24, p. 11315-11323.

- DUNNING JR, T. H.; HAY, P. J. **Modern Theoretical Chemistry**. Nova York: 1977. p.
- ETCHEGOIN, E. C. L. R. A. P. G. **Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy and related plasmonic effects**. ELSEVIER. Amsterdan 2009.
- FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, January 1, 1857 1857. v. 147, p. 145-181.
- 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.
- FONTEH, A. N.; HARRINGTON, R. J.; HARRINGTON, M. G. Quantification of free amino acids and dipeptides using isotope dilution liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Amino Acids**, Feb 2007. v. 32, n. 2, p. 203-212.
- FOX, D. et al. Simultaneous determination of efavirenz, rifampicin and its metabolite desacetyl rifampicin levels in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2011. v. 56, n. 4, p. 785-791.
- FRISCH, M. J. et al. **Gaussian'09**. Wallingford 2009.
- GERSTEN, J.; NITZAN, A. Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces. **The Journal of Chemical Physics**, 1980. v. 73, n. 7, p. 3023-3037.
- GUILLEN-CASLA, V. et al. Determination of serotonin and its precursors in chocolate samples by capillary liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, Apr 6 2012. v. 1232, p. 158-165.
- GULCIN, İ.; BUYUKOKUROGLU, M. E.; KUFREVIOLU, O. I. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. **Journal of Pineal Research**, 2003. v. 34, n. 4, p. 278-281.
- HAO, E.; SCHATZ, G. C. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. **Journal of Chemical Physics**, Jan 2004. v. 120, n. 1, p. 357-366.
- HARIHARAN, P. C.; POPLE, J. A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. **Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)**, 1973. v. 28, n. 3, p. 213-222.
- HAY, P. J.; WADT, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. **The Journal of Chemical Physics**, 1985a. v. 82, n. 1, p. 299-310.
- \_\_\_\_\_. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. **The Journal of Chemical Physics**, 1985b. v. 82, n. 1, p. 270-283.
- HOELLEIN, L.; HOLZGRABE, U. Ficts and facts of epinephrine and norepinephrine stability in injectable solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012. v. 434, n. 1-2, p. 468-480.



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

\_\_\_\_\_. 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.

IOSIN, M.; CANPEAN, V.; ASTILEAN, S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry**, Jan 25 2011. v. 217, n. 2-3, p. 395-401.

IOSIN, M. et al. Study of protein-gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Molecular Structure**, Apr 30 2009. v. 924-26, p. 196-200.

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

JAHN, S. et al. Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in the investigation of the potent skin sensitizer p-phenylenediamine and its reactivity toward nucleophiles. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Jun 30 2012. v. 26, n. 12, p. 1453-1464.

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.

JENSEN, M. A. et al. Development and evaluation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of salivary melatonin, cortisol and testosterone. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Sep 1 2011. v. 879, n. 25, p. 2527-2532.

Jl, X. et al. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: The third role of citrate. **Journal of the American Chemical Society**, Nov 14 2007. v. 129, n. 45, p. 13939-13948.

KELLY, K. L. et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2003/01/01 2002. v. 107, n. 3, p. 668-677.

KERKER, M. **The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation**. New York: Academic Press, 1969. 666 p.

KHAN, M. Z. H.; NAKANISHI, T.; OSAKA, T. Potentiometric Detection of Serotonin, Melatonin, and Their Precursors/Metabolites with Monolayer-Modified Indium Tin Oxide Electrode and Their Concentration Dependency. **Sensor Letters**, Oct 2011. v. 9, n. 5, p. 1849-1852.

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

\_\_\_\_\_. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). **Physical Review Letters**, 1997. v. 78, n. 9, p. 1667.

KOH, T. Y.; GREAVES, S. J.; GRIFFITH, W. P. VIBRATIONAL-SPECTRA OF 1,2-DIAMINOBENZENE, 4,5-DIMETHYL-1,2-DIAMINOBENZENE AND CATECHOL AND THEIR SER SPECTRA. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, May 1994. v. 50, n. 5, p. 857-873.

KOSSOR, D. **Composition, useful to treat or prevent e.g. mercury toxicity, autism, autism spectrum disorders, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, inflammation comprises melatonin and zinc (e.g. zinc acetate), or melatonin-zinc complex**: Kossor D.

KUDELSKI, A.; PETTINGER, B. SERS on carbon chain segments: monitoring locally surface chemistry. **Chemical Physics Letters**, 2000. v. 321, n. 5–6, p. 356-362.

LACK, B.; DAYA, S.; NYOKONG, T. Interaction of serotonin and melatonin with sodium, potassium, calcium, lithium and aluminium. **Journal of Pineal Research**, Sep 2001. v. 31, n. 2, p. 102-108.

LARGUINHO, M.; BAPTISTA, P. V. Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics - From genomics to proteomics. **Journal of Proteomics**, Jun 6 2012. v. 75, n. 10, p. 2811-2823.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, 1988. v. 37, n. 2, p. 785-789.

LEE, N. S. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of the catecholamine neurotransmitters and related compounds. **Analytical Chemistry**, 1988/03/01 1988. v. 60, n. 5, p. 442-446.

LIMSON, J.; NYOKONG, T.; DAYA, S. The interaction of melatonin and its precursors with aluminium, cadmium, copper, iron, lead, and zinc: An adsorptive voltammetric study. **Journal of Pineal Research**, Jan 1998. v. 24, n. 1, p. 15-21.

LIU, Z. et al. Determination of rifampicin based on fluorescence quenching of GSH capped CdTe/ZnS QDs. **Journal of Luminescence**, 2012. v. 132, n. 9, p. 2484-2488.

MACHIDA, M. et al. Simultaneous analysis of human plasma catecholamines by high-performance liquid chromatography with a reversed-phase triacontylsilyl silica column. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Jan 18 2006. v. 830, n. 2, p. 249-254.

MAHERANI, B. et al. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant l-carnosine. **Food Chemistry**, 2012. v. 134, n. 2, p. 632-640.

MAHON, E. et al. Designing the nanoparticle–biomolecule interface for “targeting and therapeutic delivery”. **Journal of Controlled Release**, 2012. v. 161, n. 2, p. 164-174.

MANABE, Y. C. et al. Rifampicin for Continuation Phase Tuberculosis Treatment in Uganda: A Cost-Effectiveness Analysis. **PLoS ONE**, 2012. v. 7, n. 6, p. e39187.

- MANDRIOLI, R. et al. Fast analysis of amino acids in wine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Electrophoresis**, Oct 2011. v. 32, n. 20, p. 2809-2815.
- MARIAM, J.; DONGRE, P. M.; KOTHARI, D. C. Study of Interaction of Silver Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. **Journal of Fluorescence**, Nov 2011. v. 21, n. 6, p. 2193-2199.
- MCNAY, G. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. **Applied Spectroscopy**, 2011. v. 65, n. 8, p. 825-837.
- MELO, L. P.; QUEIROZ, R. H. C.; QUEIROZ, M. E. C. Automated determination of rifampicin in plasma samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, 2011. v. 879, n. 24, p. 2454-2458.
- MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; RAGGI, M. A. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. **Journal of Pineal Research**, 2012. v. 53, n. 1, p. 21-28.
- MERLEN, A. et al. Surface enhanced spectroscopy with gold nanostructures on silicon and glass substrates. **Surface Science**, 2011. v. 605, n. 13-14, p. 1214-1218.
- MEYER, A.; BLOEMEKE, B.; FISCHER, K. Determination of p-phenylenediamine and its metabolites MAPPD and DAPPD in biological samples using HPLC-DAD and amperometric detection. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Jun 1 2009. v. 877, n. 16-17, p. 1627-1633.
- MIEHLICH, B. et al. Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. **Chemical Physics Letters**, 1989. v. 157, n. 3, p. 200-206.
- MIZUOCHI, T. et al. Characterization of urinary bile acids in a pediatric BRIC-1 patient: Effect of rifampicin treatment. **Clinica Chimica Acta**, Aug 16 2012. v. 413, n. 15-16, p. 1301-1304.
- MOORE, R. R.; BANKS, C. E.; COMPTON, R. G. Basal Plane Pyrolytic Graphite Modified Electrodes: Comparison of Carbon Nanotubes and Graphite Powder as Electrocatalysts. **Analytical Chemistry**, 2004/05/01 2004. v. 76, n. 10, p. 2677-2682.
- 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. **Journal of Chemical Physics**, 1982. v. 77, n. 9, p. 4408-4416.
- \_\_\_\_\_. Surface-enhanced spectroscopy. **Reviews of Modern Physics**, 1985. v. 57, n. 3, p. 783.
- MÖSSNER, R.; LESCH, K.-P. Role of Serotonin in the Immune System and in Neuroimmune Interactions. **Brain, Behavior, and Immunity**, 1998. v. 12, n. 4, p. 249-271.
- NACAK, M.; ERBAGCI, Z.; AYNACIOGLU, A. S. Human arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism and susceptibility to allergic contact dermatitis. **International Journal of Dermatology**, 2006. v. 45, n. 3, p. 323-326.

- NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nat Mater**, 2009. v. 8, n. 7, p. 543-557.
- NIE, S.; EMORY, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. **Science**, February 21, 1997. v. 275, n. 5303, p. 1102-1106.
- NYSTRÖM, A. M.; FADEEL, B. Safety assessment of nanomaterials: Implications for nanomedicine. **Journal of Controlled Release**, 2012. v. 161, n. 2, p. 403-408.
- OLDENBURG, S. J. et al. Surface enhanced Raman scattering in the near infrared using metal nanoshell substrates. **Journal of Chemical Physics**, Sep 1999. v. 111, n. 10, p. 4729-4735.
- OSWALD, S. et al. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of clarithromycin, rifampicin and their main metabolites in horse plasma, epithelial lining fluid and bronchoalveolar cells. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2011. v. 55, n. 1, p. 194-201.
- OTTO, A. The 'chemical' (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Raman Spectroscopy**, Jun-Jul 2005. v. 36, n. 6-7, p. 497-509.
- PAGE FAULK, W.; MALCOLM TAYLOR, G. Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope. **Immunochemistry**, 1971. v. 8, n. 11, p. 1081-1083.
- PARK, J. et al. Preferential adsorption of fetal bovine serum on bare and aromatic thiol-functionalized gold surfaces in cell culture media. **Journal of Colloid and Interface Science**, Nov 1 2011. v. 363, n. 1, p. 105-113.
- PASTORIZA-SANTOS, I. et al. Aerobic Synthesis of Cu Nanoplates with Intense Plasmon Resonances. **Small**, Feb 20 2009. v. 5, n. 4, p. 440-443.
- PECORA, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, Jun 2000. v. 2, n. 2, p. 123-131.
- PENN, R. L. et al. Epitaxial assembly in aged colloids. **Journal of Physical Chemistry B**, Mar 22 2001. v. 105, n. 11, p. 2177-2182.
- PERGOLESE, B.; MUNIZ-MIRANDA, M.; BIGOTTO, A. SERS study of the adsorption of 2-mercaptobenzoxazole on gold colloidal nanoparticles. **Journal of Molecular Structure**, 2009. v. 924-926, n. 0, p. 559-561.
- POLFER, N. C. et al. Infrared Spectroscopy of Phenylalanine Ag(I) and Zn(II) Complexes in the Gas Phase. **Journal of the American Chemical Society**, 2006/01/01 2005. v. 128, n. 2, p. 517-525.
- PONTAROLO, R. et al. Simultaneous Determination of the Tuberculostatic Drugs Rifampicin, Isoniazid, and Pyrazinamide by CZE. **Latin American Journal of Pharmacy**, Dec 2010. v. 29, n. 8, p. 1311-1318.
- POTARA, M. et al. Chitosan-coated anisotropic silver nanoparticles as a SERS substrate for single-molecule detection. **Nanotechnology**, Feb 2012. v. 23, n. 5.

- PRATUANGDEJKUL, J. et al. Cation- $\pi$  Interactions in Serotonin: Conformational, Electronic Distribution, and Energy Decomposition Analysis. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2006/05/01 2006. v. 2, n. 3, p. 746-760.
- RICE, K. P. et al. Solvent-Dependent Surface Plasmon Response and Oxidation of Copper Nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry C**, 2011/02/10 2011. v. 115, n. 5, p. 1793-1799.
- ROCHAT, S. et al. Cross-Reactive Sensor Arrays for the Detection of Peptides in Aqueous Solution by Fluorescence Spectroscopy. **Chemistry-a European Journal**, 2010. v. 16, n. 1, p. 104-113.
- ROZENFELD, J. H. K. **Arranjos supramoleculares de oligodeoxinucleotídeos e fragmentos de bicamada catiônica: preparação, caracterização e atividade imunoadjuvante**. 2011. 160 (Doutor). Instituto de Química, USP, São Paulo.
- RU, Q. et al. Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. **Carbohydrate Polymers**, 2012. v. 88, n. 3, p. 838-846.
- SAMANIDOU, V. et al. A simple HPLC method for the simultaneous determination of two selective serotonin reuptake inhibitors and two serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors in hair, nail clippings, and cerebrospinal fluid. **Journal of Separation Science**, Apr 2012. v. 35, n. 7, p. 839-845.
- SANCHEZ-HIDALGO, M. et al. Melatonin, A Natural Programmed Cell Death Inducer in Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, Aug 2012. v. 19, n. 22, p. 3805-3821.
- SANDALAKIS, V. et al. Investigation of Rifampicin Resistance Mechanisms in *Brucella abortus* Using MS-Driven Comparative Proteomics. **Journal of Proteome Research**, 2012/04/06 2012. v. 11, n. 4, p. 2374-2385.
- SANT'ANA, A. C. et al. The adsorption of 2,2':6',2''-terpyridine, 4'-(5-mercaptopentyl)-2,2':6',2''-terpyridinyl, and perchlorate on silver and copper surfaces monitored by SERS. **Polyhedron**, 2003. v. 22, n. 13, p. 1673-1682.
- SANT'ANA, A. C. et al. The adsorption of 2,2':6',2''-terpyridine, 4'-(5-mercaptopentyl)-2,2':6',2''-terpyridinyl, and perchlorate on silver and copper surfaces monitored by SERS. **Polyhedron**, 2003. v. 22, n. 13, p. 1673-1682.
- SANT'ANA, A. C. **Caracterização do ácido equárico e materiais derivados por espectroscopia Raman intensificada (uso de substratos metálicos SERS de alto desempenho)**. 2005. 141 (Doutorado). Instituto de Química, USP, São Paulo.
- SANTOS, H. F. D. et al. Espectro infravermelho e análise conformacional do composto 3-fenil-2-oxo-1,2,3-oxatiazolidina. **Química Nova**, 1999. v. 22, p. 732-736.
- SARADA, B. V. et al. Electrochemical Oxidation of Histamine and Serotonin at Highly Boron-Doped Diamond Electrodes. **Analytical Chemistry**, 2000/04/01 2000. v. 72, n. 7, p. 1632-1638.

- SARDAR, R. et al. Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future†. **Langmuir**, 2009/12/15 2009. v. 25, n. 24, p. 13840-13851.
- SARKAR, A. R.; SARKAR, M. Cadmium(II) complex with L-carnosine as a ligand and the tautomeric change of the imidazole moiety upon complexation. **Journal of Chemical Research-S**, Aug 1997. n. 8, p. 304-305.
- SATHYADEVI, P. et al. Studies on the effect of metal ions of hydrazone complexes on interaction with nucleic acids, bovine serum albumin and antioxidant properties. **Inorganica Chimica Acta**, 2012. v. 384, n. 0, p. 83-96.
- SATOH, N. et al. Photoinduced Coagulation of Au Nanocolloids. **The Journal of Physical Chemistry**, 1994/02/01 1994. v. 98, n. 8, p. 2143-2147.
- SHALAEV, V. M. et al. Nonlinear Optical Phenomena in Nanostructured Fractal Materials. **Journal of Nonlinear Optical Physics & Materials**, 1998. v. 07, n. 01, p. 131-152.
- SHARMA, K. et al. Interactions of ferrimagnetic glass/glass-ceramics with bovine serum albumin. **Applied Surface Science**, Jan 15 2012. v. 258, n. 7, p. 2356-2361.
- SHEMETOV, A. A.; NABIEV, I.; SUKHANOVA, A. Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles. **Acs Nano**, 2012/06/26 2012. v. 6, n. 6, p. 4585-4602.
- SINGH, S.; WRONA, M. Z.; DRYHURST, G. SYNTHESIS AND REACTIVITY OF THE PUTATIVE NEUROTOXIN TRYPTAMINE-4,5-DIONE. **Bioorganic Chemistry**, Sep 1992. v. 20, n. 3, p. 189-203.
- SONG, Y. Z. et al. Density-functional theory studies on standard electrode potentials of half reaction for L-adrenaline and adrenalinequinone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Nov 1 2005. v. 15, n. 21, p. 4671-4680.
- SPRIK, M.; HUTTER, J.; PARRINELLO, M. Ab initio molecular dynamics simulation of liquid water: Comparison three gradient-corrected density functionals. **Journal of Chemical Physics**, Jul 15 1996. v. 105, n. 3, p. 1142-1152.
- STEPHENS, P. J. et al. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **The Journal of Physical Chemistry**, 1994/11/01 1994. v. 98, n. 45, p. 11623-11627.
- SUTHERLAND, W. S.; WINEFORDNER, J. D. Colloid filtration: A novel substrate preparation method for surface-enhanced Raman spectroscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, 1992. v. 148, n. 1, p. 129-141.
- TAVANA, T. et al. Sensitive voltammetric determination of epinephrine in the presence of acetaminophen at a novel ionic liquid modified carbon nanotubes paste electrode. **Journal of Molecular Liquids**, 2012. v. 168, n. 0, p. 69-74.
- THOMAS, S. et al. Studies on adsorption of carnosine on silver nanoparticles by SERS. **Chemical Physics Letters**, 2010. v. 491, n. 1-3, p. 59-64.

THYSSEN, J. P.; WHITE, J. M. L.; EUROPEAN SOCIETY OF CONTACT, D. Epidemiological data on consumer allergy to p-phenylenediamine. **Contact Dermatitis**, 2008. v. 59, n. 6, p. 327-343.

TIAN, Z. Q.; REN, B.; WU, D. Y. Surface-enhanced Raman scattering: From noble to transition metals and from rough surfaces to ordered nanostructures. **Journal of Physical Chemistry B**, Sep 2002. v. 106, n. 37, p. 9463-9483.

TORREGGIANI, A.; BONORA, S.; FINI, G. Raman and IR spectroscopic investigation of zinc(II)-carnosine complexes. **Biopolymers**, 2000 2000. v. 57, n. 6, p. 352-364.

TORREGGIANI, A.; TADDEI, P.; FINI, G. Characterization of dioxygenated cobalt(II)-carnosine complexes by Raman and IR spectroscopy. **Biopolymers**, 2002 2002. v. 67, n. 1, p. 70-81.

TORREGGIANI, A. et al. Vibrational study on the cobalt binding mode of Carnosine. **Journal of Molecular Structure**, 2002. v. 641, n. 1, p. 61-70.

TORREGGIANI, A.; TAMBA, M.; FINI, G. Binding of copper(II) to carnosine: Raman and IR spectroscopic study. **Biopolymers**, 2000 2000. v. 57, n. 3, p. 149-159.

TSURUTA, Y. et al. Sensitive determination of carnosine in urine by high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Feb 1 2010. v. 878, n. 3-4, p. 327-332.

TU, Q.; EISEN, J.; CHANG, C. Surface-enhanced Raman spectroscopy study of indolic molecules adsorbed on gold colloids. **Journal of Biomedical Optics**, Mar-Apr 2010. v. 15, n. 2.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, 1951. v. 11, p. 55-75.

VANGALA, K. et al. Studying Protein and Gold Nanoparticle Interaction Using Organothiols as Molecular Probes. **Journal of Physical Chemistry C**, Feb 9 2012. v. 116, n. 5, p. 3645-3652.

WADT, W. R.; HAY, P. J. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. **The Journal of Chemical Physics**, 1985. v. 82, n. 1, p. 284-298.

WAGNER, C. C.; BARAN, E. J. Vibrational spectra of polaprezinc, a polymeric Zn(II) complex of carnosine. **Journal of Raman Spectroscopy**, 2008. v. 39, n. 4, p. 474-477.

WANG, A.-Q. et al. An ultra-high sensitive bioanalytical method for plasma melatonin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using water as calibration matrix. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Aug 1 2011. v. 879, n. 23, p. 2259-2264.

WANG, H. et al. Quantification of monoamine neurotransmitters and melatonin in sea lamprey brain tissues by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**, Jan 30 2012. v. 89, p. 383-390.

\_\_\_\_\_. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection and ultra-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry method for

the determination of indoleamine neurotransmitters and their metabolites in sea lamprey plasma. **Analytica Chimica Acta**, Apr 6 2012. v. 721, p. 147-153.

WANG, Z.-H. et al. Carbon nanotube-intercalated graphite electrodes for simultaneous determination of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 2003. v. 540, n. 0, p. 129-134.

WHITESIDES, G. M. The 'right' size in nanobiotechnology. **Nat Biotech**, 2003. v. 21, n. 10, p. 1161-1165.

WON, J. J. et al. Electrospun core-shell nanofibers from homogeneous solution of poly(vinyl alcohol)/bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012. v. 50, n. 5, p. 1292-1298.

XU, X. et al. Determination of three major catecholamines in human urine by capillary zone electrophoresis with chemiluminescence detection. **Analytical Biochemistry**, 2012. v. 427, n. 1, p. 10-17.

YANG, Y. et al. Preparation of Au-Ag, Ag-Au core-shell bimetallic nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. **Scripta Materialia**, 2008. v. 58, n. 10, p. 862-865.

YANG, Z. et al. The nano-Au self-assembled glassy carbon electrode for selective determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2007. v. 54, n. 2, p. 230-235.

YIN, M. et al. Copper oxide nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**, Jul 6 2005. v. 127, n. 26, p. 9506-9511.

YUSTE, C. et al. Topological control of the spin coupling in dinuclear copper(II) complexes with meta- and para-phenylenediamine bridging ligands. **Inorganica Chimica Acta**, 2010. v. 363, n. 9, p. 1984-1994.

ZHANG, H.-M. et al. Studies of the electrochemical behavior of epinephrine at a homocysteine self-assembled electrode. **Talanta**, 2002. v. 56, n. 6, p. 1081-1088.

ZHANG, H.; OKUNI, J.; TOSHIMA, N. One-pot synthesis of Ag-Au bimetallic nanoparticles with Au shell and their high catalytic activity for aerobic glucose oxidation. **Journal of Colloid and Interface Science**, Feb 1 2011. v. 354, n. 1, p. 131-138.

ZHOU, Y. et al. A novel and simple biosensor based on poly(indoleacetic acid) film and its application for simultaneous electrochemical determination of dopamine and epinephrine in the presence of ascorbic acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, Jun 2012. v. 16, n. 6, p. 2203-2210.

ZINELLU, A. et al. Measurement of carnosine, homocarnosine and anserine by FASI capillary electrophoresis UV detection: Applications on biological samples. **Talanta**, May 15 2011. v. 84, n. 3, p. 931-935.

\_\_\_\_\_. Reverse injection capillary electrophoresis UV detection for serotonin quantification in human whole blood. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, May 1 2012. v. 895, p. 182-185.



