

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

VINICIUS PEREIRA DOS ANJOS

ESPECTROSCOPIA RAMAN/SERS APLICADA AO MONITORAMENTO
DE ANTIBIÓTICOS

CURITIBA

2023

VINICIUS PEREIRA DOS ANJOS

ESPECTROSCOPIA RAMAN/SERS APLICADA AO MONITORAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

RAMAN/SERS spectroscopy applied to antibiotics monitoring

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito para a aquisição de título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Eleodoro de Góes.

Coorientador: Prof. Dr. Arandi Giane Bezerra Junior.

CURITIBA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



VINICIUS PEREIRA DOS ANJOS

ESPECTROSCOPIA RAMAN/SERS APLICADA AO MONITORAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Física da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Física .

Data de aprovação: 25 de Maio de 2023

Dr. Rafael Eleodoro De Goes, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Denise Maria Zezell, Doutorado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Dr. Emilson Ribeiro Viana Junior, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 26/05/2023.

Dedico este trabalho aos meus pais Juarez e Maria.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho, quero agradecer primeiramente a Deus, por sua bondade e graça que me abençoou durante estes anos de pesquisa. Aos meus pais, que são meus exemplos de vida e inspiração. Ao meu pai, que já não está mais aqui nesta terra, por tudo que me ensinou, te amarei eternamente. À minha mãe Maria, por todo amor e dedicação que me proporcionou. Às minhas irmãs por todo apoio e incentivo. Minha família é minha base.

Quero agradecer em especial aos meus orientadores. Professor Rafael de Góes, muito obrigado por todos os ensinamentos, pela companhia, pela insistência e pela confiança depositada em mim para a execução deste trabalho. Professor Arandi Bezerra Jr., você é minha inspiração, o mundo seria muito melhor se todos os professores e cientistas tivessem um pouquinho da sua paixão pelo ensino e busca pelo conhecimento dentro de si. Obrigado pela dedicação de vocês, pela cooperação, todos os conselhos e aprendizado.

Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas de laboratório pela parceria. Quero agradecer profundamente a minha amiga Caroline Marangoni, você foi importantíssima no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigado pelas horas e horas de discussão e troca de conhecimento, por toda ajuda, serei eternamente grato, você é uma inspiração. Agradeço imensamente ao meu colega Rafael Nadas pela oportunidade de me convidar para fazer os experimentos no laboratório LabNS, e por todo saber compartilhado, pelo incentivo e ideias criativas. Eu aprendi muito com vocês.

Aproveito e deixo registrado meu agradecimento ao laboratório LabNS, sob responsabilidade do prof. Dr. Ado J. de Vasconcelos, da UFMG pela oportunidade de trabalho, horas de laboratório e disponibilidade do uso de seu *software* de análise, e aos diretores da escola em que leciono prof. Juliano N. da Rosa e prof. Simone H. Natal, pela disponibilidade em permitir a minha ida a Belo Horizonte no final agitado de um ano letivo escolar. Agradeço ao Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, e dra. Líbera Costa, pelas amostras dos medicamentos, objetos de estudo desta pesquisa.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação.

“As leis da natureza nada mais são que pensamentos matemáticos de Deus.”

- Johannes Kepler.

RESUMO

A detecção rápida e precisa de antibióticos é um desafio crítico na área da saúde, mas uma nova abordagem baseada em espectroscopia Raman/SERS pode ser uma solução. Esta pesquisa apresenta a obtenção dos espectros (“*fingerprints*”) de sete diferentes antibióticos utilizando esta técnica. Os antibióticos avaliados foram ampicilina, meropenem, ceftazidima, polimixina B, vancomicina, gentamicina e ciprofloxacino. Para a obtenção dos espectros Raman, foram utilizados quatro comprimentos de onda de excitação, sendo 532 nm, 633 nm, 785 nm e 1064 nm. Com a finalidade de obter um aumento do sinal do antibiótico, quando este é diluído em água, nanopartículas foram sintetizadas pela técnica LASiS (*Laser Ablation in Liquid Solution*) e usadas como mediadoras da amplificação do sinal Raman. As NPs foram caracterizadas por diversas técnicas, incluindo TEM, AFM, DLS, UV-Vis e potencial zeta. As análises permitiram compreender melhor as propriedades das nanopartículas e como elas podem influenciar na obtenção do espectro SERS de cada antibiótico. Os resultados mostraram que a técnica de espectroscopia Raman é capaz de fornecer espectros únicos para cada tipo de antibiótico avaliado, permitindo sua identificação precisa. Além disso, as nanopartículas sintetizadas pela técnica LASiS podem contribuir para a melhoria da sensibilidade e reprodutibilidade da técnica. Foi possível obter espectros SERS dos antibióticos utilizando NPs de Au, Ag, Co, Cu e V. Os dados obtidos neste estudo sugerem que a técnica de espectroscopia Raman é uma opção promissora para a identificação de diferentes tipos de antibióticos em amostras de diferentes origens.

Palavras-chave: espectroscopia Raman; antibióticos; nanopartículas; ablação à laser;

ABSTRACT

Rapid and accurate detection of antibiotics is a critical challenge in healthcare, but a new approach based on Raman/SERS spectroscopy may be a solution. This research presents the Raman spectrum acquisition (“fingerprints”) of seven different antibiotics using this technique. The antibiotics evaluated were ampicillin, meropenem, ceftazidime, polymyxin B, vancomycin, gentamicin, and ciprofloxacin. Four excitation wavelengths were used to obtain the Raman spectra, namely 532 nm, 633 nm, 785 nm, and 1064 nm. In order to amplify the Raman signal of the antibiotic when diluted in water, nanoparticles were synthesized by the LASiS (Laser Ablation in Liquid Solution) technique and used as mediators of signal amplification. The NPs were characterized by various techniques, including TEM, AFM, DLS, UV-Vis, and zeta potential. The analyses allowed a better understanding of the properties of the nanoparticles and how they can influence the SERS spectrum acquisition of each antibiotic. The results showed that the Raman spectroscopy technique could provide unique spectra for each type of antibiotic evaluated, allowing for precise identification. Furthermore, the nanoparticles synthesized by the LASiS technique can improve the sensitivity and reproducibility of the Raman spectroscopy technique. It was possible to obtain SERS spectra of antibiotics using Au, Ag, Co, Cu and V NPs. The data obtained in this study suggest that the Raman spectroscopy technique is a promising option for identifying different types of antibiotics in samples of different origins.

Keywords: Raman spectroscopy; antibiotics; nanoparticles; laser ablation.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Relação do comprimento de onda do fóton incidente e espalhado em uma molécula hipotética.....	30
Figura 2 - Diagrama de transição entre estados de energia envolvidos no espalhamento Rayleigh e Raman	30
Figura 3 - Vibrações características dos grupos CH ₂ e CH ₃	34
Figura 4 - Difração de uma abertura circular	35
Figura 5 - Limite do poder separador	35
Figura 6 - Ressonância de plásmons de superfície localizados	37
Figura 7 - Ablação a laser em meio líquido	40
Figura 8 - Esquema de interação da luz com as nanopartículas coloidais em movimento Browniano, fundamento da técnica de DLS	45
Figura 9 - Ilustração simplificada de um AFM	47
Figura 10 - Representação esquemática do potencial zeta	49
Figura 11 - Anel beta-lactâmico.....	50
Figura 12 - Estrutura geral da penicilina.....	51
Figura 13 - Estrutura geral das cefalosporinas.....	52
Figura 14 - Estrutura molecular dos carbapenêmicos	52
Figura 15 - Estrutura da estreptomicina	53
Figura 16 - Estrutura das quinolonas	54
Figura 17 - Estrutura da vancomicina.....	55
Figura 18 - Estrutura da Polimixina B.....	55
Figura 19 - Metodologia Raman	59
Figura 20 - Espectrômetro Cora 5001	60
Figura 21 - Microscópio Raman Witec alpha 300R	60
Figura 22 - Laser Brilliant B.....	61
Figura 23 - Esquema de síntese com duplo feixe	62
Figura 24 - Espectrômetro Ocean Optics USB 2000+.....	63
Figura 25 - DLS Microtrac Nanotrak Ultra	64
Figura 26 - AFM SPM-9700 HT.....	64
Figura 27 - JEOL JEM 1200EX-II.....	65
Figura 28 - Litesizer 500.....	65

Figura 29 - A) Espectrômetro Andor Shamrock. B) Amostra no equipamento	66
Figura 30 - Gota-a-gota para mapa Raman	67
Figura 31 - Suspensões coloidais - <i>double wavelength pulse</i> , Amostras de Au, Ag, Cu, Co e Fe; LA: sintetizadas com comprimento de onda fundamental (1064 nm, infravermelho) e primeiro harmônico (532 nm, verde); LB: apenas 532 nm; LC apenas 1064 nm.	68
Figura 32 - Suspensões coloidais (LA).....	69
Figura 33 - Suspensão coloidal (VNP)	69
Figura 34 - Extinção de coloides de AuNP	70
Figura 35 - Extinção de coloides de AgNP	70
Figura 36 - Extinção de coloides de CuNP	70
Figura 37 - Extinção de coloides de CoNP.....	70
Figura 38 - Extinção de coloides de FeNP	71
Figura 39 - Extinção de coloides de VNP	72
Figura 40 - Potencial zeta de coloides de AuNP	72
Figura 41 - Potencial zeta de coloides de AgNP	72
Figura 42 - Potencial zeta de coloides de CuNP	73
Figura 43 - Potencial zeta de coloides de CoNP	73
Figura 44 - Potencial zeta de coloides de FeNP	73
Figura 45 - DLS do coloide de AuNP para as condições de síntese LA, LB e LC.....	74
Figura 46 - TEM do coloide de AuNP. A) imagem. B) histograma de tamanho.....	75
Figura 47 - Dados de rugosidade e tamanho – AFM - AuNP	75
Figura 48 - DLS do coloide de AgNP para as condições de síntese LA, LB e LC.....	76
Figura 49 - TEM do coloide de AgNP. A) imagem. B) histograma de tamanho.....	77
Figura 50 - Dados de rugosidade e tamanho – AFM - AgNP	77
Figura 51 - DLS do coloide de CuNP para as condições de síntese LA, LB e LC	78
Figura 52 - TEM do coloide de CuNP. A) imagem. B) histograma de tamanho	79
Figura 53 - DLS do coloide de CoNP para as condições de síntese LA, LB e LC	80
Figura 54 - TEM do coloide de CoNP. A) imagem. B) histograma de tamanho	80
Figura 55 - DLS do coloide de FeNP para as condições de síntese LA, LB e LC.....	81
Figura 56 - TEM do coloide de FeNP. A) imagem. B) histograma de tamanho.....	82
Figura 57 - DLS do coloide de VNP para as condições de síntese LA.....	82
Figura 58 - Espectro Raman da ampicilina	83

Figura 59 - Espectro Raman da ceftazidima	84
Figura 60 - Espectro Raman do meropenem	85
Figura 61 - Espectro Raman da gentamicina	87
Figura 62 - Espectro Raman da polimixina B	88
Figura 63 - Espectro Raman do cirpofloxacino.....	89
Figura 64 - Espectro Raman da vancomicina.....	90
Figura 65 - Espectros Raman dos ATB betalactâmicos.....	91
Figura 66 - Medida SERS (laser em 5,2 mW, tempo de integração de 500 ms) da ampicilina na concentração de 5,4 mM. Mapa e os espectros para os pontos A: ampicilina com VNP e B: apenas ampicilina	92
Figura 67 - Medida SERS (laser em 10 mW, tempo de integração de 0,1 s) da ampicilina na concentração de 26,9 mM	94
Figura 68 - Amostra de ampicilina queimada indicando a presença de carbono amorfo	94
Figura 69 - Medida SERS (laser com potências variadas, tempo de integração de 10 s) da ampicilina na concentração de 26,9 mM	96
Figura 70 - Medida SERS (laser em 752,2 μ W, tempo de integração de 0,5 s) da ampicilina na concentração de 5,4 mM. Mapa e os espectros para os pontos A: ampicilina com CoNP e B: apenas ampicilina	97
Figura 71 - Medida SERS (laser em 20,5 mW, tempo de integração de 0,5 s) do ciprofloxacino na concentração de 5,2 mM. Mapa e os espectros para os pontos A: ciprofloxacino com CuNP e B: apenas ciprofloxacino	98
Figura 72 - Medida SERS (laser em 752,2 μ W, tempo de integração de 15 s) do ciprofloxacino na concentração de 5,2 mM com AuNP	99
Figura 73 - Medida SERS (laser em potências variadas, tempo de integração de 10 s) do ciprofloxacino na concentração de 5,2 mM com CuNP	100
Figura 74 - Medida SERS do meropenem na concentração de 4,6 mM com CuNP (tempo de integração de 15 s) e CoNP (tempo de integração de 0,1 s)	101
Figura 75 - Medida SERS (tempo de integração de 10 s) da vancomicina na concentração de 6,7 mM com AgNP	102
Figura 76 - Medida SERS (laser em 10 mW, tempo de integração de 0,1 s) da vancomicina na concentração de 67,3 mM. Mapa e espectros da vancomicina com AgNP	104

Figura 77 - meropenem com AuNp apresentando fluorescência	105
Figura 78 - Coordenadas polares	119
Figura 79 - Polarização	121

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Prós e contras das técnicas analíticas atualmente usadas no TDM, em comparação com o SERS	26
Tabela 2 - Comportamento de estabilidade de coloides baseados no valor do potencial zeta	49
Tabela 3 - Seleção de fármacos.....	58
Tabela 4 - Metais para síntese	62
Tabela 5 - Assinalamento de bandas da ampicilina	83
Tabela 6 - Assinalamento de bandas do meropenem	86
Tabela 7 - Resultados	106

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica
API	Princípios ativos farmacêuticos
ATB	Antibiótico
CME	Centro de Microscopia Eletrônica
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DP-LAL	Ablação em líquido com pulso duplo
IR	Infravermelho
LASiS	Ablação a laser em solução
LSPR	Ressonância de plásmons de superfície localizada
MALDI-TOF	Ionização/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de “voo”
NP	Nanopartícula
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAT	Tecnologia analítica de processo
RAM	Resistência antimicrobiana
SAED	Difração de elétrons em área selecionada
SERS	Espectroscopia Raman intensificada por superfície
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Nanotecnologia e suas aplicações: laboratório Fotonanobio	20
1.2	Antibióticos e bactérias	23
1.3	Justificativa	25
1.4	Objetivos	27
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
2.1	Detecção de substâncias em baixas concentrações	28
2.1.1	Espectroscopia Raman	28
2.1.2	Espectroscopia SERS	36
2.1.3	Espectroscopia Raman/SERS na farmacologia	37
2.2	Nanopartículas	40
2.2.1	Processo de síntese por ablação a laser	40
2.2.2	LASiS: Double wavelength pulse	42
2.3	Técnicas de caracterização de nanopartículas	43
2.3.1	Espectroscopia UV-Vis	44
2.3.2	Espalhamento dinâmico de Luz	45
2.3.3	Microscopia de Força Atômica	46
2.3.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão	47
2.3.5	Potencial zeta	48
2.4	Antibióticos e suas classes	50
2.5	Resistência aos antimicrobianos	56
3	METODOLOGIA	58
3.1	Seleção e preparação dos antibióticos	58
3.2	Espectroscopia Raman	59
3.3	Síntese e caracterização de nanopartículas	61
3.4	Espectros SERS	66

4	RESULTADOS	68
4.1	Síntese de NPs por LASiS e caracterização	68
4.1.1	UV-Vis e potencial zeta	70
4.1.2	TEM, AFM e DLS.....	73
4.2	Espectroscopia Raman	82
4.3	Espectroscopia SERS	92
4.4	Resultados finais	105
5	CONCLUSÕES	107
5.1	Trabalhos futuros	108
5.2	Trabalhos publicados	109
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICE 1 – Ressonância de plásmon de superfície: extinção	118

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são fármacos utilizados para tratamento de agentes infecciosos e são capazes de lesar ou matar os microrganismos invasores sem prejudicar as células do hospedeiro, podendo este ser humano ou animal.

O uso exacerbado de antibióticos (ATBs) tem levado ao aumento de cepas resistentes e, por consequência, prejudicando procedimentos complexos na área da saúde, que tem a intervenção dos antibióticos de maneira necessária, trazendo prejuízo a estes procedimentos e criticalizando pacientes (MUNITA, ARIAS, 2015).

Quando o microrganismo (bactéria, fungo, vírus ou parasita) sofre alteração em seu mecanismo de defesa quando exposto aos antimicrobianos caracteriza-se a Resistência Antimicrobiana (RAM), que é, atualmente, considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Então o aumento no tempo de internação, nos custos hospitalares, das taxas de hospitalização, e principalmente ao da morbimortalidade da população afetada são resultados deste problema (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020).

O monitoramento de medicamentos antibióticos é um aspecto crucial do atendimento ao paciente, que envolve o rastreamento dos níveis do fármaco na corrente sanguínea de um paciente. Isto ajuda a garantir que os pacientes recebam o melhor atendimento possível, minimizando os riscos de efeitos adversos e resistência a antibióticos. Isto é importante por várias razões:

- A dosagem ideal: os antibióticos precisam ser administrados na dose correta para serem eficazes.
- Prevenção da resistência: o uso excessivo ou indevido de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos.
- Tratamento individualizado: cada paciente é diferente e pode metabolizar os medicamentos de maneira diferente.

- Monitorar e evitar interações medicamentosas: os antibióticos podem interagir com outros medicamentos que o paciente está tomando, o que pode levar a efeitos adversos.

Além da monitoração dos fármacos, a detecção rápida e precisa de bactérias resistentes a antibióticos é essencial para a prevenção e controle de infecções. A espectroscopia Raman pode ser usada para identificar bactérias resistentes a antibióticos com base na interação da luz com a molécula. Estas bactérias podem apresentar mudanças moleculares em sua parede celular e membranas que as diferenciam das bactérias sensíveis a antibióticos. Essas mudanças podem ser detectadas pela espectroscopia Raman, que pode ser usada para identificar rapidamente bactérias resistentes a antibióticos em amostras clínicas (CAILLETAUD, DE BLEYE, *et al.*, 2018).

Além disso, a espectroscopia Raman é uma técnica analítica poderosa que tem o potencial de revolucionar o monitoramento de drogas. No monitoramento de medicamentos, a espectroscopia Raman pode ser usada para medir os níveis de medicamentos na corrente sanguínea de um paciente, sem a necessidade de coleta de grandes quantidades de sangue ou outros procedimentos invasivos. Isso pode ser particularmente útil para pacientes que requerem monitoramento frequente, como aqueles com doenças crônicas ou que estão passando por quimioterapia. A espectroscopia Raman também pode ser usada para monitorar a pureza e a estabilidade dos medicamentos, o que é importante para garantir que os pacientes recebam um tratamento eficaz (JAWORSKA, FORNASARO, *et al.*, 2016). Com mais desenvolvimento e refinamento, pode se tornar uma ferramenta padrão para monitoramento de medicamentos no futuro.

A espectroscopia Raman possui várias aplicações na área da saúde, e se tornou uma das mais famosas técnicas de análise no campo farmacêutico até então. Suas mais variadas aplicações incluem o estudo polimórfico, identificação de matéria prima, identificação de “falsificação”, determinação da quantidade e homogeneidade dos princípios ativos farmacêuticos (API) e melhorar o entendimento sobre o processo farmacêutico (PAT - tecnologia analítica de processo). Há possibilidade de aplicação desta técnica espectroscópica Raman

como alternativa para detectar a resistência aos antibióticos e rastrear o surto de bactérias patogênicas. Porém, devido às limitações causadas pela fluorescência, ou pelos sinais espalhados de baixa intensidade provenientes dos compostos poucos concentrados, a espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS) veio como uma solução para estes problemas (WNAG, LI, *et al.*, 2019) (CAILLETAUD, DE BLEYE, *et al.*, 2018).

O primeiro passo para produção do aumento do sinal no espectro Raman é a utilização de nanopartículas (NPs). A ablação a laser em solução (LASiS) é uma técnica que produz NPs estáveis em água ou em solventes orgânicos, e não necessita de moléculas estabilizadoras ou outros produtos químicos. Focando um feixe de laser em um alvo submerso em um volume de líquido, podem-se capturar os materiais resultantes da ablação diretamente no solvente (AMENDOLA, MENEGHETTI, 2009).

As nanopartículas usadas no SERS são normalmente feitas de metais nobres, como ouro ou prata, que possuem propriedades ópticas únicas que intensificam o sinal Raman. As NPs são funcionalizadas com grupos químicos específicos que podem se ligar às moléculas alvo de interesse. Isso fornece um método de detecção altamente seletivo e sensível para vestígios de moléculas. A afinidade das nanopartículas por moléculas pode ser aumentada pela modificação de sua superfície com grupos funcionais específicos. Por exemplo, as nanopartículas podem ser revestidas com moléculas que possuem alta afinidade pela molécula alvo, como anticorpos ou aptâmeros¹. Isso permite que as nanopartículas se liguem especificamente à molécula alvo, aumentando a sensibilidade e a seletividade da medição SERS (MUHAMMAD, HUANG, 2021).

Além de sua afinidade por moléculas-alvo, o tamanho e a forma das nanopartículas também podem afetar sua a eficácia do mecanismo SERS. Por exemplo, nanopartículas menores tendem a ter maior razão área por volume, o que pode resultar em uma maior intensificação do espalhamento Raman. Além disso, certas formas de nanopartículas, como nanotubos ou nano-estrelas, demonstraram ter fatores de aprimoramento SERS mais altos em comparação

¹ São oligo-nucleotídeos (fragmentos curtos de uma cadeia simples de ácido nucleico – DNA ou RNA) que se ligam a moléculas específicas como um alvo (CDTN, 2018).

com nanopartículas esféricas (densidade superficial de cargas) (ISRAELSEN, HANSON, VARHIS, 2015).

No geral, a afinidade das nanopartículas pelas moléculas alvo é um fator importante na detecção do SERS. Ao modificar a superfície de nanopartículas com grupos funcionais específicos e otimizar seu tamanho e forma, o SERS pode ser usado como uma técnica altamente sensível e seletiva para a detecção de vestígios de moléculas em uma variedade de aplicações, incluindo monitoramento de drogas, monitoramento ambiental e ensaios bioanalíticos.

1.1 Nanotecnologia e suas aplicações: laboratório Fotonanobio

Particularmente, o laboratório Fotonanobio-UTFPR, de caráter interdisciplinar, tem participado de trabalhos e pesquisas que têm aplicações em investigação de toxicidade (controle microbiológico), SERS e produção de *quantum dots* usando nanopartículas.

Dentre diversos trabalhos publicados em revistas, ou apresentados em congressos, alguns são destaque. Bezerra, *et al.* (2017), demonstram no trabalho intitulado *Surface-enhanced Raman scattering using bismuth nanoparticles: a study with amino acids* nanopartículas de bismuto foram produzidas através da técnica de ablação a laser, e foi demonstrado experimentalmente que tais NPs têm atividade SERS testada em diversos aminoácidos (glicina, serina, glutamina, cisteína, metionina, tirosina e prolina). Isto levou a conclusão de que nanopartículas de bismuto podem ser tão boas/eficientes quanto as de ouro (ou outro metal nobre) para realização de medições SERS.

Nesta mesma linha, outros trabalhos importantes foram feitos mostrando que outros tipos de metais, que não somente ouro e prata, tem atividade SERS. Dentre os trabalhos, destacam-se: *Plasmonics and SERS activity of post-transition metal nanoparticles* (BEZERRA, A. *et al.*, 2018), *SERS activity of Co, Ni and Bi nanoparticles* (THALER, MACHADO, *et al.*, 2019), *Plasmonics and SERS activity: beyond gold and silver* (MACHADO, NADAS, *et al.*, 2019). São descritos experimentos que demonstram que metais do tipo índio (In), chumbo

(Pb), estanho (Sn), antimônio (Sb), ferro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni) dão aumento na intensidade relativa do sinal Raman, em amostras testadas de morfina e/ou prolina. Ou seja, estes metais exibem plásmons de ressonância e expressam efetivamente sinal SERS ativo, com significativos fatores de intensificação.

Inclui-se também um outro trabalho onde a atividade SERS é produzida com o uso de nanopartículas de uma liga metálica chamada Terfenol-D. No trabalho *Synthesis and Optical Characterization of Terfenol-D Nanoparticles*, Nadas, *et al.* (2019), demonstram que esta nanopartícula também usada como substrato obtém sinal SERS, usando uma amostra de prolina. Estes trabalhos são relevantes pois demonstram que para se obter um sinal SERS, não é necessário utilizar somente ouro ou prata (metais nobres), mas outros metais também têm esta funcionalidade. Estes outros metais têm possíveis aplicações na nanofotônica, como por exemplo uma aplicação em biosensores.

Este último trabalho citado, seguiu-se para um trabalho maior, apresentado na forma de dissertação por Rafael Nadas (2019): *Produção e Caracterização de Nanopartículas de Terfenol-D*, o qual mostrou resultados experimentais da síntese de nanopartículas deste composto, realizado com êxito, bem como suas caracterizações e aplicabilidades, dos quais substratos SERS foram feitos para identificação de moléculas de prolina, ureia e glicina.

Em continuidade, o trabalho *Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície com Nanopartículas de Ni, Co e Bi para a Detecção de Biomoléculas e Microrganismos* realizado por Juliana Thaler, *et al.* (2020) usou nanopartículas de metais não convencionais. A autora demonstrou a atividade SERS para a detecção de aminoácidos e ureia, bem como interrogação de fungos *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *Fusarium spp.*, *F. pedrosoi*, *F. pugnacius* e *F. monophora*. Um resultado importante deste trabalho é a demonstração de que tais NPs são promissoras para biosensores baseados em SERS, o que inclui a identificação e diferenciação de fungos (em gênero e espécie). É importante destacar que esses resultados preliminares requerem desenvolvimento de protocolos de preparação de amostras e realização de espectros em quantidade necessária para pautar melhor a análise estatística e

no futuro contribuir com pesquisas na área da biomedicina e diagnóstico molecular.

O trabalho *Síntese, Caracterização e Investigação da Atividade SERS de Nanopartículas de Metais Não-convencionais* demonstra que nanopartículas de metais de pós-transição, como antimônio, bismuto, chumbo, estanho e índio, ao serem aplicados em uma amostra biológica (como aminoácidos do tipo cisteína, glicina, glutamina, metionina, prolina, tirosina e triptofano) apresentam aumento de sinal SERS, comparáveis às nanopartículas convencionais de ouro e prata, por exemplo (MACHADO, 2021).

Caroline Marangoni e *et al.* (2021) apresentam no Congresso Brasileiro de Infectologia, o trabalho publicado no *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, nomeado *Detecção e Caracterização de Antimicrobianos Usando Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície*. Os resultados demonstram que os espectros SERS da Ampicilina que entra em contato com uma bactéria apresenta diferença quando tal bactéria é resistente ou sensível. Em continuidade a este trabalho, a autora, em 2022, defende sua dissertação intitulada *Antimicrobial Stewardship: Uma Contribuição Baseada na Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície – SERS*, apresentando uma investigação sobre uma possível contribuição à saúde quando mostra o poder de análise da espectroscopia SERS em antibióticos β -lactâmicos.

O trabalho *Síntese Física e caracterização de Pontos Quânticos de Tungstênio*, que demonstra que a produção de nanopartículas do laboratório Fotonanobio é capaz de produzir pontos quânticos, ou seja, nanopartículas de semicondutores cujo tamanho é menor do que o raio de Bohr do seu éxciton. Em seu trabalho, a autora conseguiu produzi-los, utilizando tungstênio através da ablação a laser em meio líquido. Os pontos quânticos foram testados em amostras biológicas de ureia para a técnica SERS demonstrando que estas nanopartículas muito pequenas podem servir como alternativa para suspensões coloidais para um material que apresente biocompatibilidade, e serem utilizados em técnica de detecção e caracterização de materiais biológicos (SANTOS, 2022).

Em conclusão, estes trabalhos apresentados resumidamente neste trecho, trabalhos publicados em periódicos, apresentados em congressos e seminários, dissertações defendidas, trabalhos de iniciação científica, trabalhos em andamento e parcerias demonstram a capacidade e relevância do laboratório Fotonanobio, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, na área de biofotônica. Os pesquisadores, professores e estudantes, expõem a capacidade de domínio da técnica de síntese de nanopartículas de metais convencionais, e destacando-se também os não convencionais através da ablação a laser tanto quanto diversas aplicabilidades das NPs, ressaltando suas aplicações na área da biotecnologia, produzindo um trabalho de relevância para a sociedade, principalmente na área da saúde. Tais resultados têm o potencial de impactar pesquisas futuras no manejo de antibióticos.

1.2 Antibióticos e bactérias

Antibióticos podem ser considerados uma das formas de quimioterapia de sucesso ao longo da história da ciência e medicina. Não há como negar o quão significativo os tratamentos com esses fármacos contribuíram para o controle de doenças infecciosas que são a principal causa de mortalidade humana, e inegável a quantidade de vidas salvas graças a eles. Comumente é associado o início da “era antibiótica” ao tempo em que se desenvolveu o trabalho e pesquisa de Paul Ehrlich e Alexander Fleming, mas há traços na história de que algo próximo ao que se entende por antibióticos já foi utilizado em períodos anteriores ao século XVIII (AMINOV, 2010).

Em esqueletos humanos, na antiga Núbia sudanesa (350-550 dC), foram encontrados vestígios de tetraciclina, bem como esqueletos do período romano tardio do Oásis de Dakhla no Egito. Tal substância estava presente na dieta desses povos, o que resultou em baixas taxas de doenças infecciosas (infecção óssea) nessas populações (AMINOV, 2010). Para prevenir doenças complicadas por causa de feridas abertas, há mais de 2000 anos utilizava-se micróbios produtores de antibióticos com cataplasmas de pão mofado na antiga Sérvia, China, Grécia e Egito (HUTCHINGS, TRUMAN, WILKINSON, 2019).

No século XIX, a população mundial mudava do campo para a cidade, acompanhando os processos de industrialização, e a imigração tornou as cidades superlotadas, onde seus habitantes viviam em condições precárias de moradia, e tinham serviços públicos de abastecimento de água e eliminação de resíduos inadequados ou inexistentes. Estas condições resultaram em repetidos surtos de cólera, disenteria, tuberculose, febre tifoide, gripe, febre amarela e malária (JAMA, 1999). Por volta dos anos de 1900, as doenças infecciosas representavam as principais causas das mortes na população mundial.

Nesta época, muitas dessas doenças começaram a declinar devido a melhorias na saúde pública. Em 1910 Paul Ehrlich desenvolveu o Salvarsan (arsênico da Salvação), um composto sintético que foi considerado o primeiro antibiótico, a fim de tratar a *Treponema pallidum* (agente causador da sífilis), ao qual deu início aos estudos de drogas sintéticas (GELPI, GILBERTSON, TUCKER, 2015, HUTCHINGS, TRUMAN e WILKINSON, 2019).

Contudo, o marco da era dos antibióticos corresponde à famosa história de Alexandre Fleming que em 1928, durante suas férias, esqueceu uma placa de Petri contaminada com *Staphylococcus aureus* e percebeu, ao retornar, que a placa estava com um mofo, e que onde existia o fungo aparecia um halo transparente, ao qual ele concluiu que poderia ter efeitos bactericidas (FLEMING, 1929).

Fleming identificou que o fungo do gênero *Penicillium notatum* era capaz de inibir o crescimento bacteriano, porque apresentava uma substância antiestafilocócia que ele nomeou de “penicilina”. Porém somente 11 anos após esta descoberta, a penicilina se tornou utilizável na prática clínica, devido aos trabalhos conjuntos de Fleming, Ernst Chain e Howard Florey no isolamento e purificação do fungo (AMINOV, 2010, DAVIES, DAVIES, 2010, FLEMING, 1929).

Com o passar dos anos, durante o século XX, diversos antibióticos a base de fungos, bactérias e compostos sintéticos foram desenvolvidos. Com esse desenvolvimento a infecção por agentes causadores de doenças infecciosas caiu evidentemente. No começo do século, a expectativa de vida ao nascer da população estadunidense era de 47,3 anos, e no Brasil, abaixo de 45 anos. Então, ao final do século, a expectativa de vida da população brasileira está acima dos 65 anos, e dos Estados Unidos supera os 75 anos. Do ponto de vista

epidemiológico, tais razões desse aumento são a disponibilidade de água potável e principalmente a descoberta dos antimicrobianos (BELLOSO, 2009).

Com o passar dos anos e a utilização de forma exagerada e inadequada de antimicrobicos, associada ao não desenvolvimento de novos compostos químicos antimicrobianos, fez com que as bactérias, no decorrer da evolução, desenvolvessem mecanismos de resistência, criando assim bactérias fortes e capazes de degradarem, ou seja, inibirem a ação do fármaco, provocando sua inativação (MARANGONI, 2022). O surgimento de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos em bactérias patogênicas tornou-se uma ameaça à saúde pública, pois a ausência de um tratamento eficaz para doenças infecciosas corresponde ao retorno a era pré-antibiótica.

À medida que esse problema continua a crescer, são necessárias ações multifacetárias para descrever e classificar bactérias resistentes e seus agentes antimicrobianos, para que através de dados de epidemiológicos possam ser identificados mecanismos de resistência para utilização de fármacos corretos e na dosagem adequada (MAGIORAKOS, SRINIVASAN, *et al.*, 2011).

1.3 Justificativa

Um grande perigo ameaça a população mundial: bactérias super-resistentes. A resistência antimicrobiana terá um grande impacto na economia e na saúde da população, se nada for feito para contornar esta situação. Estima-se que 2,4 milhões de pessoas na Europa, América do Norte e Austrália morrerão devido às infecções causadas por microrganismos resistentes nos próximos 30 anos e causará um custo de US\$ 3,5 bilhões por ano (HOFER, 2019).

A importância do uso adequado de antibióticos tem como finalidade: otimizar as prescrições dos mesmos para que se obtenha melhor resultado terapêutico ou profilático, minimizar efeitos colaterais baseando-se na seleção dos germes patogênicos e na emergência da resistência microbiana, proporcionar um ambiente de maior segurança para o paciente, redução de custos de tratamento/hospitalares e, principalmente, evitar a proliferação de

bactérias super-resistentes. A tecnologia para a detecção em pequenas quantidades de antibióticos em solução pode auxiliar neste processo.

Ao comparar diferentes metodologias para monitoramento de drogas terapêuticas (TDM), Jaworska, *et al.* (2016), mostram que o SERS tem potencial para o monitoramento de drogas terapêuticas, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Prós e contras das técnicas analíticas atualmente usadas no TDM, em comparação com o SERS

Técnica	Descrição	Prós	Contras
Métodos baseados em cromatografia	A cromatografia separa compostos individuais por sua interação física ou química com um material imóvel.	Padrão ouro; Métodos robustos com sensibilidade e sensibilidade superiores;	Demorado; Testes desenvolvidos em laboratório; Variabilidade interlaboratorial; Efeitos de matriz; Necessário alto conhecimento técnico; Altos custos de instalação, treinamento pessoal e validação de métodos.
GC-MS/MS LC-MS/MS¹	Uma vez separados, as técnicas seletivas combinadas de MS fornecem a identificação de compostos baseada em massa.	Relativamente livre de interferências; Reatividade cruzada de classe de drogas/metabólitos reduzida.	
Plataformas de imunoensaio	O analito é detectado por sua ligação com uma molécula de ligação específica, que na maioria dos casos é um anticorpo específico do analito.	Pequena quantidade de amostra (< 100µl); Executar em sistemas automatizados, contínuos e de acesso aleatório; Não há necessidade de limpeza da amostra; Capacidades de multiplexação.	Várias etapas para alcançar a quantificação do analito; Especificidade e sensibilidade reduzidas; Muitas vezes mostram viés significativo; Reatividade cruzada de anticorpos; Interferências de bilirrubina, hemoglobina, alto teor de lipídios, teor de proteína muito alto ou muito baixo, anticorpo endógeno, várias drogas e metabólitos.
ACMIA, CEDIA, CMIA, ELISA, EMIT, FPLA, MEIA, PETNIA²			
Métodos baseados em SERS	A dispersão de luz inelástica em moléculas absorvidas na superfície de metal é medida.	Não há necessidade de preparo de amostra; medição rápida; capacidades de multiplexação; Disponibilidade de espectrômetros Raman portáteis.	Muitas vezes RSD ³ alto dos substratos SERS; otimização do método necessário para cada droga.

Fonte: Adaptado de JAWORSKA, FORNASARO, *et al.* (2016)

¹GC-MS/MS, Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; LC-MS/MS, Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa; ²ACMIA, Imunoensaio magnético conjugado de Anticorpos; CEDIA, Imunoensaio de Doador de Enzima Clonado; CMIA, Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes; ELISA, Ensaio imunossorvente ligado a enzima; EMIT, Técnica de imunoensaio enzimático multiplexado; FPIA, Imunoensaio de polarização de fluorescência; MEIA, Imunoensaio enzimático de micropartículas; PETNIA, Imunoensaio de inibição turbidimétrica aprimorada por partículas; ³RSD, Desvio Padrão Relativo.

Faz-se necessária uma metodologia (acompanhada de uma tecnologia) que identifique a resistência bacteriana (onde se inclui o monitoramento de drogas) de maneira rápida e eficaz, pois este método auxiliará na redução da RAM e prova que o trabalho multiprofissional (tal qual propõe o presente trabalho) é fundamental para o êxito do combate à resistência antimicrobiana (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020).

1.4 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho é a obtenção do espectro SERS de antibióticos relevantes na terapia intensiva em solução aquosa com diferentes nanopartículas.

Objetivos específicos:

- Selecionar antibióticos relevantes.
- Medir o espectro Raman dos ATBs selecionados.
- Síntese de NPs via LASiS.
- Caracterização de NPs.
- Obtenção de espectro SERS dos ATBs selecionados.

A presente dissertação é dividida em Introdução, na qual são apresentados uma contextualização do trabalho com nanopartículas no laboratório Fotonanobio-UTFPR, um breve relato sobre antibióticos e monitoramento de drogas para combate à resistência antimicrobiana e os objetivos do trabalho. A Fundamentação Teórica apresenta uma breve revisão de literatura dos principais temas que serão discutidos ao longo do trabalho, como antibióticos, espectroscopia Raman/SERS e ablação a laser.

No capítulo Metodologia relata-se como a parte experimental do trabalho foi executada e os equipamentos e técnicas utilizados. Ao final, no capítulo referente aos Resultados, apresentam-se os principais feitos desta dissertação, em conjunto com uma discussão a respeito. No último capítulo, os resultados são retomados e é apresentada uma Conclusão geral, evidenciando a contribuição desta pesquisa para a ciência.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo são apresentadas uma contextualização e explicação da fundamentação teórica base para este trabalho. Inicia-se explicando sobre a tecnologia Raman/SERS, bem como a produção de nanopartículas via ablação a laser, necessária para o incremento do sinal SERS e suas técnicas de caracterização. Também se discorre sobre as características dos antibióticos e mecanismos de resistência antimicrobiana.

2.1 Detecção de substâncias em baixas concentrações

A espectroscopia Raman é uma técnica que, a partir da interação da radiação eletromagnética com a matéria, torna possível a caracterização e detecção moleculares de substâncias orgânicas e inorgânicas em matrizes complexas tais como biofluidos. Devido à sua limitação em casos onde desejam-se caracterizar amostras pouco concentradas, o efeito SERS vem como importante recurso para contornar o problema. A seguir estão descritas as fundamentações dessas técnicas e suas aplicações.

2.1.1 Espectroscopia Raman

A luz interage com a matéria de diferentes formas. Através dessa interação, podemos determinar a constituição de um material, é o que acontece na espectroscopia Raman. É uma técnica de espectroscopia molecular que obtém informação resultante de um processo de espalhamento da luz, informações referentes as vibrações intra- e intermoleculares, fornecendo assim um espectro característico para cada molécula de forma singular, análogo a uma impressão digital da amostra iluminada (*fingerprint*).

A espectroscopia Raman é uma técnica de análise que se baseia no espalhamento inelástico de uma onda eletromagnética (luz) incidente em uma molécula para identificar a estrutura molecular de uma amostra. Neste efeito, a atividade está ligada à variação do momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação incidente (SALA, 2008).

O espalhamento Raman foi previsto em 1923 por Smekal, mas somente em 1928 foi comprovado por dois grupos de pesquisas: Raman e Krishnan, na Índia ao qual são atribuídos o fenômeno e ao qual destinado o prêmio Nobel em 1930, e Landsberg e Mandelstam na Rússia. Somente em 1953 foi construído o primeiro espectrômetro Raman comercial, após o desenvolvimento do monocromador, usando uma lâmpada de descarga de mercúrio com comprimento de onda de 435,8 nm como fonte de radiação. Nas décadas seguintes, vários compostos foram identificados usando esta configuração. Porém, o uso deste tipo de fonte dificultava a aplicação e reprodutibilidade dos experimentos. Somente após a invenção do laser em 1960, com o uso de espectrômetros se tornou mais rápido e fácil de ser reproduzido o sinal de espalhamento Raman. O seu uso como fonte de luz foi apresentado pelos brasileiros Sérgio Porto e Wood em 1962 (MITSUTAKE, POPPI, BREITKREITZ, 2019).

O espalhamento *Raman* envolve uma transição entre um estado eletrônico e um estado virtual de maior energia, mas com energia abaixo do estado eletrônico excitado subsequente, e retorno para o estado eletrônico mais excitado vibracionalmente emitindo um fóton de energia menor que o inicial. O espalhamento de luz leva a uma perda ou ganho de energia pelo fóton através da excitação de modos vibracionais da molécula. A energia de um fóton é calculada pela Equação 1:

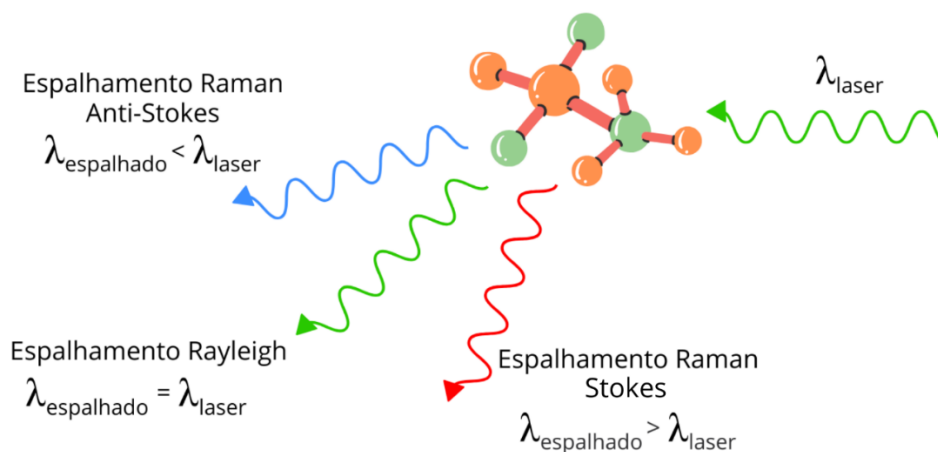
$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck, c a velocidade da luz no vácuo, λ o comprimento de onda do fóton e ν sua frequência. A diferença entre a energia absorvida e emitida corresponde à diferença de energia entre dois estados ressonantes do material e é independente da energia absoluta do fóton.

A energia da radiação inelasticamente espalhada pode ser maior ou menor que a energia incidente (espalhamento anti-Stokes e Stokes, respectivamente) e essa diferença é igual à transição vibracional da molécula. Caso as energias incidente e espalhada tenham os mesmos valores, o espalhamento será elástico (também chamado de espalhamento Rayleigh) e

nenhuma informação vibracional molecular estará nele contida (RAZA, 2019), como mostra a Figura 1:

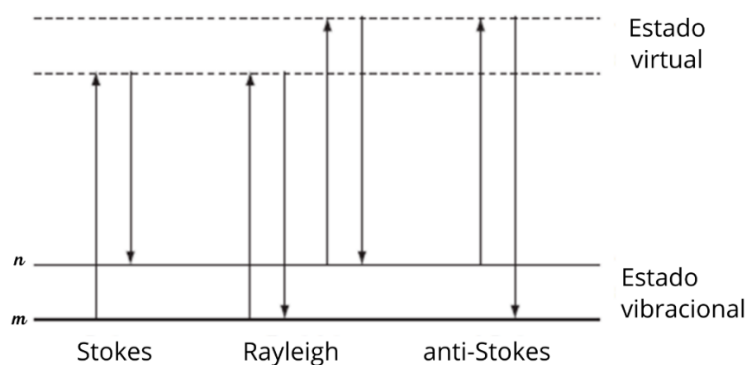
Figura 1 - Relação do comprimento de onda do fóton incidente e espalhado em uma molécula hipotética



Fonte: o autor (2023)

Normalmente, o espalhamento Raman é caracterizado pelo espalhamento de Stokes por causa da sua maior intensidade de sinal, mas ocasionalmente o espalhamento anti-Stokes é registrado. Estes processos vibracionais são demonstrados na Figura 2 e as energias envolvidas são obtidas das frequências da fonte de luz usada e detectada, isto é, o comprimento de onda da radiação eletromagnética, envolvidas.

Figura 2 - Diagrama de transição entre estados de energia envolvidos no espalhamento Rayleigh e Raman



Fonte: adaptado de SMITH, DENT (2005)

Considerando as moléculas numa temperatura ambiente, a maior parte delas estarão no nível vibracional de energia mais baixo. Quando a luz atinge a amostra, mesmo não sendo ressonante com a diferença de níveis de energia vibracionais, ela pode ser espalhada com energia diferente, como ilustrado na Figura 2. Nesta excitação convencionou-se a existência de um estado energético virtual, que media a cessão de energia para a molécula, resultando em um fóton espalhado com energia menor que a do incidente, o que corresponde a um desvio na frequência da luz espalhada em relação à luz incidente.

A maioria dos fótons será espalhada da forma Rayleigh, ou seja, este será o processo dominante. A luz é espalhada com a mesma energia, isto é, o comprimento de onda da luz espalhada é o mesmo que a incidente ($h\nu_n \rightarrow h\nu_n$, ou seja $\lambda_{antes} = \lambda_{depois}$).

Na Figura 2 representa-se os processos de espalhamento decorridos no efeito Raman. Para o espalhamento Stokes, a molécula no estado vibracional m absorve energia e é promovida para um estado vibracional excitado de alta energia n (fótons espalhados tem menos energia que os fótons incidentes: $h\nu_n \rightarrow h(\nu_n - \nu_m)$, ou seja $\lambda_{antes} < \lambda_{depois}$). O processo contrário, denominado anti-Stokes, diz respeito a transferência de energia para o fóton espalhado. Devido à energia térmica, algumas moléculas podem estar presentes em um estado excitado como n e retornam para um estado fundamental m (fótons espalhados tem mais energia que os fótons incidentes: $h\nu_n \rightarrow h(\nu_n + \nu_m)$, ou seja $\lambda_{antes} > \lambda_{depois}$) (SMITH, DENT, 2005).

O estado vibracional de menor energia m é mostrado na base, com estados de energia crescente acima dele. Tanto o ganho de energia (setas para cima) quanto a energia espalhada (setas para baixo) têm energias muito maiores do que a energia de uma vibração (SMITH, DENT, 2005).

Para entender o espalhamento Raman é importante destacar como são as propriedades vibracionais dos átomos que compõe uma molécula. Ao interagir uma onda eletromagnética com as cargas elétricas do material, acontece o espalhamento (*Stokes* e *anti-Stokes*), ao qual induz oscilações características de cada ligação química do material analisado, assim como exemplificado na Figura 1.

Considerando que cada molécula possui em sua estrutura n átomos, têm-se $3n$ graus de liberdade. Quanto aos graus de liberdade relacionados a translação e rotação, não há alteração na distância entre os átomos, e nestes casos são 6 graus de liberdade. Logo, considera-se $3n - 6$ graus de liberdades onde esta alteração ocorre nas ligações químicas da molécula. Associa-se a tais vibrações o oscilador do tipo massa-mola, obedecendo à lei de Hooke (Equação 2) (SCHRADER, 1995).

$$F = -kx \quad (2)$$

onde F é a força das interações do movimento, k sendo uma contante de proporcionalidade e x a distância da posição da massa até a posição de equilíbrio. Associando a Equação 3 com a forma diferencial da segunda lei de Newton, obtém-se:

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = -kx \quad (3)$$

Uma equação diferencial de segunda ordem, com solução do tipo:

$$x = x_0 \cos(2\pi vt + \varphi) \quad (4)$$

onde v é a frequência de oscilação em um tempo t , com φ sendo a constante de fase. Ao resolver a equação, encontra-se a frequência de oscilação na forma:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (5)$$

Levando em consideração uma molécula diatômica, reescreveríamos a Equação 5 na seguinte forma:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (6)$$

tal que μ é a massa reduzida:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \quad (7)$$

Utiliza-se número de onda (v') medido em cm^{-1} , ao invés da frequência, onde na Equação 8 temos o número de onda referente à frequência vibracional:

$$v' = \frac{v}{c} = \frac{1}{\lambda} \rightarrow v' = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (8)$$

Transpondo este problema para um sistema quântico, cujo as grandezas como ordem das massas e dimensões das moléculas exigem, compara-se com um oscilador harmônico quântico, no qual as moléculas só existem em estados de energias definidos, tais que as energias de vibrações são descritas como:

$$E_i = hv \left(v_i + \frac{1}{2} \right), v_i = 1, 2, 3, \dots \quad (9)$$

na qual h é a constante de Planck e v_i o número quântico de vibração. Conclui-se que para osciladores harmônicos, um número de modos de energia, isto é, o número de modos vibracionais aumenta linearmente conforme o número de átomos da molécula. E cada modo tem uma energia maior quanto maior for a força de ligação e menor for a massa reduzida envolvida.

Relacionando a Equação 8 e 9, temos:

$$v' = \frac{E_i}{hc \left(v_i + \frac{1}{2} \right)} \quad (10)$$

Onde é possível observar uma relação entre o número de onda e a energia de vibração (MACHADO, 2021, NADAS, 2019).

Além dos modos vibracionais, as moléculas podem ter modos rotacionais. A fim de explicar um modelo mecânico rotativo, utilizando-se o modelo de rotor rígido, a teoria quântica do momentum angular pode ser usada para determinar os níveis de energia (THORNTON, REX, 2006). Num sistema rotacional puro, a energia cinética é expressa em termos do momento angular L e da inércia rotacional I , demonstrados na Equação 11:

$$E_R = \frac{L^2}{2I} \quad (11)$$

O momento angular é quantizado na forma:

$$L = \sqrt{l(l+1)}\hbar \quad (12)$$

Então, os níveis de energia são dados por:

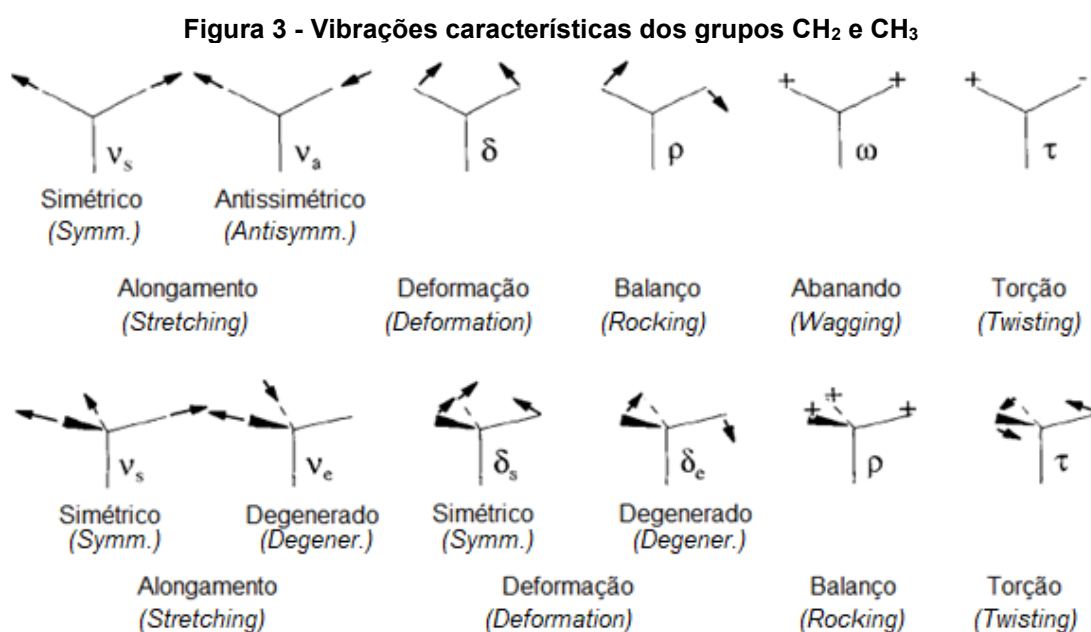
$$E_R = \frac{\hbar^2 l(l+1)}{4\pi I} \quad (13)$$

Em um sistema molecular real, é possível excitar os modos vibracionais e rotacionais simultaneamente. Combinando a Equação 9 e 13 temos:

$$E = E_R + E_i = \frac{h^2 l(l+1)}{4\pi I} + hv \left(v_i + \frac{1}{2} \right) \quad (14)$$

Uma molécula diatômica que é estimulada a um estado de excitação emite um fóton decaindo para um estado de energia menor. Então, é possível observar um amplo espectro de fótons emitidos, correspondente às diversas transições rotacionais e vibracionais.

Como exemplificação, dentre os hidrocarbonetos, são apresentadas vibrações características para os grupos CH₂ e CH₃ (compostos orgânicos presentes nas estruturas dos medicamentos deste trabalho) como ilustrado na Figura 3:

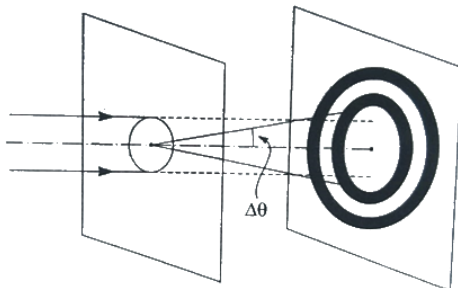


Fonte: Adaptado de SCHRADER (1995)

Devido à maneira que os espectrômetros Raman são construídos, para uma mesma grade de difração (que é responsável por dispersar a radiação de modo que a medida no CCD possa indicar a intensidade para diferentes comprimentos de onda), para um mesmo comprimento do banco ótico, uma melhor resolução espectral é obtida para menores comprimentos de onda de excitação. Ou seja, a resolução espectral depende da resolução espacial, característica do equipamento, e do comprimento de onda do laser de excitação.

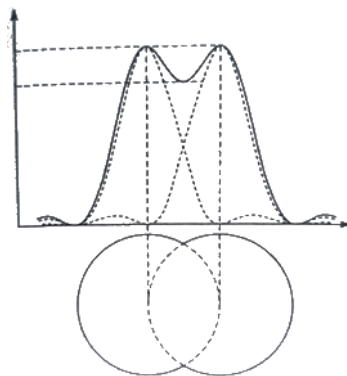
A definição de resolução espacial (critério de Rayleigh) é definida pela distância em que dois pontos próximos podem ser distinguidos, conforme ilustrados na Figura 4 e Figura 5:

Figura 4 - Difração de uma abertura circular



Fonte: NUSSENZVEIG (1998)

Figura 5 - Limite do poder separador



Fonte: NUSSENZVEIG (1998)

De maneira similar à grade de difração, a difração de uma fenda de abertura circular é dada pela Equação 15, onde $\Delta\theta$ é a separação, e a a abertura da fenda (NUSSENZVEIG, 1998):

$$\Delta\theta \approx 0,61 \frac{\lambda}{a} \quad (15)$$

Resultado que implica no cálculo do poder de resolução, mostra que quando o comprimento de onda do laser decresce, para um mesmo espectrômetro com rede de difração fixa, a resolução espacial aumenta.

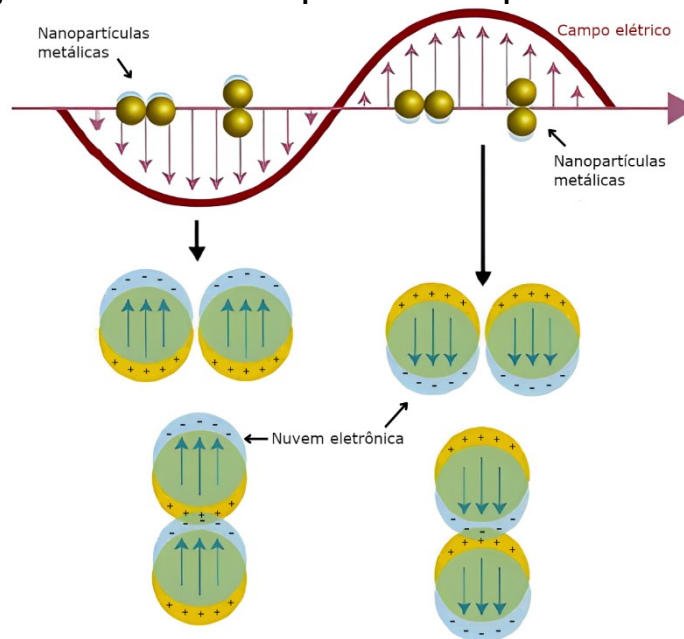
2.1.2 Espectroscopia SERS

Ao se tratar de ferramenta de análise, a espectroscopia Raman é utilizada para caracterização de moléculas. Os dados obtidos, a partir de informações vibracionais, dentro de um espectro fornece informações utilizadas para identificações de estruturas e mudanças que ocorrem biologicamente em compostos ativos. Infelizmente, devido à sua baixa sensibilidade e interferência de fluorescência, esta técnica pode ser limitante em alguns estudos não somente na área da saúde, mas a todos aqueles que necessitam analisar estruturas de compostos em escalas muito pequenas. Por sorte, graças a muitos estudos e desenvolvimento tecnológico, a Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS) tem o potencial de contornar estes obstáculos.

O efeito SERS foi observado num primeiro momento por Fleischman *et al.* em 1974, mas teve um mecanismo proposto de fato por Jeanmarie e Van Duyne, e Albrecht e Creighton em 1977. A amplificação da intensidade do sinal é devido a dois mecanismos: químico – que envolve a criação de novos estados moleculares devido a interação direta com o metal, e eletromagnético – quando o campo elétrico é intensificado localmente na vizinhança do metal nanoestruturado (KNEIPP, KNEIPP e MOSKOVITS, 2006) (JAWORSKA, FORNASARO, *et al.*, 2016).

O mecanismo SERS envolve o confinamento do campo eletromagnético em nanoestruturas metálicas. Os elétrons da superfície sofrem influência deste campo, movimentando-se coletivamente e contrariamente ao campo, provocando uma oscilação da nuvem eletrônica, como representado na Figura 6. Esse confinamento ocorre devido à ressonância de plásmons de superfície localizados - LSPR, que resulta no aumento do campo eletromagnético (desenvolvimento algébrico no Apêndice I). Esse aumento intensifica o espalhamento Raman nos chamados “*hot spots*”, onde o aumento do sinal pode chegar a uma ordem de 10^{10} . Esta concentração do campo elétrico nas proximidades das nanoestruturas é o que permite a detecção de baixas concentrações de moléculas de interesse (New Trends in Plasmonic (bio)sensing, 2018).

Figura 6 - Ressonância de plásmons de superfície localizados



Fonte: MACHADO (2021)

Portanto, o aumento do sinal SERS é atrelado a um substrato nano-estruturado. A preparação dos substratos implicará na contribuição (ou não) da intensificação do sinal eletromagnético espalhado, e depende do tamanho, forma e estrutura do material utilizado (THALER, 2020).

2.1.3 Espectroscopia Raman/SERS na farmacologia

Muito se fala sobre a sensibilidade da espectroscopia Raman/SERS enquanto ferramenta analítica no campo farmacêutico. Cailletaud, et. al (2017) apontam que o número de pesquisas relacionadas à técnica nesta área cresceu exponencialmente em um intervalo de tempo que compreende o período de 1990 e 2016. Com esses dados, os autores fazem uma revisão crítica sobre o tema, mostrando desde os conceitos da metodologia, descrevendo suas etapas, e uma ênfase nas aplicações atuais da técnica no campo da farmácia, e analisam os critérios de validação da técnica em cada tipo de aplicação.

A primeira aplicação apresentada se refere ao controle de qualidade com o uso do SERS. Como este modelo de espectroscopia tem uma alta sensibilidade, se torna apropriado usá-la como técnica de controle de qualidade, bem como para identificação e detecção de impurezas ou drogas em baixas

doses. Esta aplicação está sendo utilizada nos últimos anos em vários campos, principalmente na indústria alimentícia, biomédica e farmacêutica.

Uma outra aplicação é a identificação e quantificação de drogas ilícitas, que se baseia no mesmo princípio utilizado no teste de doping. Os autores apresentam alguns trabalhos realizados com esta finalidade, ao qual os pesquisadores já detectaram, quantificaram e validaram testes de diferentes analitos em diferentes matrizes, foram listadas várias drogas, aos quais pode-se exemplificar a Anfetamina (em solução aquosa), Cannabinoids (solução aquosa), Cocaína (solução aquosa, saliva humana e urina humana), Metanfetamina (solução aquosa, urina e saliva humana), Morfina (solução aquosa), Nicotina e Tramadol (ambas em solução aquosa).

Com a intuito de garantir a qualidade final de um produto farmacêutico, uma última finalidade identificada pelos autores foi a quantificação de drogas farmacêuticas. A espectroscopia pode ajudar na detecção de pequenas impurezas no medicamento, bem como a identificação de princípios ativos, e ajuda a monitorar a concentração de substâncias em biofluidos. Análises do tipo quantitativa, semiquantitativa e de detecção foram utilizadas por diversos pesquisadores, em diferentes matrizes, com analitos do tipo Aspirina (solução aquosa e comprimido), Levofloxacino (solução aquosa, urina humana e artificial), Paracetamol (em solução aquosa e microfilmes poliméricos), ácido Penicilóico (microfilmes poliméricos), entre outros.

Os autores reconhecem o potencial da tecnologia, e entendem que o SERS será uma técnica analítica interessante para uso no campo farmacêutico, mas consentem que apesar do grande potencial, é necessário investimentos em pesquisa para melhorar as performances analíticas utilizando esta espectroscopia. O método tem potencial para análise, mas por enquanto, segundo os autores, é prematuro dizer se este meio substituirá métodos clássicos já validados. É um desafio que deve ser vencido, pois graças a suas enormes vantagens, o recurso deixa “portas abertas” para pesquisa e inovações para o seu uso.

Outra revisão crítica é feita por Jaworska, *et al.* (2016) onde analisam o potencial da espectroscopia SERS, mas focando agora para o monitoramento

de drogas para a terapia de câncer, como quimioterápicos, imunossupressores e anticonvulsivantes. Entende-se que métodos são desenvolvidos para construir um modelo que visa simplificar informações espectroscópicas complexas, para que tal técnica possa ser de fato aplicada na saúde. Medicamentos do tipo Doxorubicina, Mitoxantrona, Paclitaxel, Metrotexato, já foram identificadas em diferentes matrizes, como saliva, sangue humano, plasma sanguíneo, soro humano, água, entre outros.

Os autores identificaram que realmente houve um aumento nos últimos anos em trabalhos na área, mas quando a aplicação é em monitoramento de drogas terapêuticas há poucas publicações. Acreditam que isto é devida a dificuldade de realizar SERS em amostras complexas, como biofluidos. Se comparar o nível das pesquisas encontradas, boa parte delas se encontram na fase ainda de prova de conceito, ou demonstração da tecnologia. Ainda não foi possível identificar uma incorporação do SERS no ramo hospitalar enquanto técnica validada e aprovada.

Ao se tratar de resistência antimicrobiana, há vários métodos pelos quais sua averiguação é possível, dentro os quais o SERS está presente. É o que mostram Leonard, *et al.* (2018), em sua revisão bibliográfica a qual tem o objetivo de descrever e mostrar diferentes pesquisas que concentram seus estudos no desenvolvimento de testes de sensibilidades aos antibióticos. Os autores listam diversas técnicas, dentre as quais cita-se a difusão em disco, Etest, MALDI-TOF, difusão no ágar. As referidas técnicas demandam grande tempo e/ou custo elevado para sua execução e obtenção do resultado final (algumas para mais de 16 horas), e apresentam dificuldades para sua execução. Como citam os autores, cada uma tem vantagens e desvantagens.

Ao abordarem o SERS, os autores reconhecem que é um método criativo de análise, mas é limitado pela especificidade do ensaio, pois cada medida é específica para cada cepa bacteriana. Além da especificidade da espectroscopia SERS, cada um dos diferentes tipos de análise deve, segundo os autores, levar em consideração o custo, a possibilidade de multiplexação de ensaios, a facilidade do uso, a precisão e rapidez no resultado. Os autores ainda questionam se essas tecnologias têm a capacidade de se tornar um próximo

padrão ouro e se irão realmente ajudar a reduzir casos de resistência antimicrobiana.

2.2 Nanopartículas

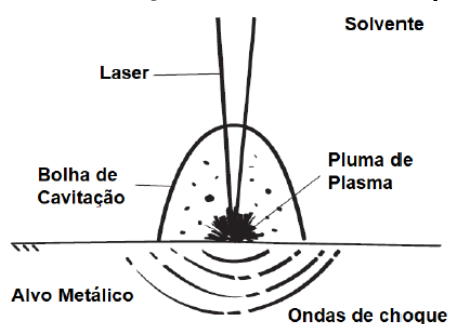
Como citado anteriormente, para produzir um sinal SERS intenso e detectável é necessário um cuidado na preparação de substratos nano estruturados. A seguir é apresentado como essas nanoestruturas, no caso as nanopartículas em suspensão coloidal, são produzidas via ablação a laser em líquidos, que são depositadas numa lâmina para secagem e formação do substrato.

2.2.1 Processo de síntese por ablação a laser

A técnica LASiS, *Laser Ablation Synthesis in Solution* (Síntese por Ablação a Laser em Solução) baseia-se no princípio de que quando um feixe de laser irradia um material de estado sólido em um meio líquido, a energia fornecida pelo pulso de laser pode ser absorvida pelo alvo e levar à formação de uma nuvem de plasma em expansão contendo o material ablado (

Figura 7). Isso é acompanhado pela emissão de uma onda de choque que libera energia no líquido circundante. Quando o plasma esfria, ele libera seu calor para o líquido, que se transforma em vapor quente. Isso leva à formação de uma bolha de cavitação oscilante contendo tanto a matéria ablada quanto o vapor líquido, onde ocorre a formação das partículas (FAZIO, GÖKE, *et al.*, 2020).

Figura 7 - Ablação a laser em meio líquido



Fonte: MACHADO (2021)

Após o colapso da bolha de cavitação, outra onda de choque é gerada e as partículas são liberadas no solvente. No caso de soluções aquosas e materiais como ouro ou zinco, a estabilização eletrostática da partícula é então alcançada devido a superfícies parcialmente ou totalmente oxidadas, respectivamente, onde a adsorção de íons ocorre e forma uma camada dupla eletrostática. Por este método, uma variedade de nanomateriais podem ser obtidos puramente em diferentes solventes, o que abre uma ampla gama de aplicações.

A formação de nanopartículas pode ocorrer por diversos mecanismos e é influenciada por diferentes parâmetros do laser (como duração do pulso, comprimento de onda, energia, taxa de repetição) e materiais envolvidos. Por exemplo, se geradores pulsos de laser ultracurtos são utilizados, a taxa de ablação é tão rápida que o solvente não sofre aquecimento quando o alvo é atingido pelo laser (sem transferência de calor) e permanece frio, o que permite a ablação a laser em solventes com ponto de ebulição baixo (BARCIKOWSKI, AMENDOLA, *et al.*, 2016). A escolha da composição do solvente, morfologia do alvo, fluência do laser, duração do pulso, tempo de radiação são importantes no controle e repetibilidade da síntese das NPs (MACHADO, 2021).

No geral, a ablação a laser em solução é uma técnica de síntese poderosa que oferece várias vantagens sobre outras técnicas (rota química, por exemplo) de preparação de nanoestruturas. Sua capacidade de fornecer síntese direta de materiais sólidos e flexibilidade nos tipos de solventes a torna uma ferramenta valiosa em muitas áreas de pesquisa. LASiS é considerada uma técnica verde porque evita o uso de produtos químicos e solventes tóxicos, minimiza a geração de resíduos e permite a síntese eficiente de nanopartículas com controle sobre tamanho, forma e composição. Ela preserva a integridade das características do material, permitindo a síntese direta de um material sólido sem a necessidade de preparação ou dissolução a partir de sais metálicos, evitando possíveis alterações ou degradação que podem ocorrer durante o preparo.

Há interferência mínima do espaço ao redor, afinal esta técnica é realizada em um ambiente líquido, o que ajuda a minimizar a interferência do local em torno, como ar ou contaminantes. Desse modo as NPs obtidas são particularmente útil para aplicações com amostras sensíveis ao ar ou que

requerem um ambiente específico, como amostras biológicas. Considera-se também a flexibilidade nos tipos de materiais (*bulk*), incluindo metais, cerâmicas, polímeros e materiais biológicos. As características apresentadas evidenciam que se trata de uma técnica versátil e que pode ser aplicada a uma variedade de áreas de pesquisa.

2.2.2 LASiS: Double wavelength pulse

O processo de ablação a laser necessita de análise de uma série de variáveis que influenciam no resultado final e na compreensão desse resultado. Diversos fatores implicarão na taxa de produção e tamanho das NPs. Por exemplo, para o alvo, pode-se citar a composição química e morfologia em sua estrutura *bulk*; para o líquido utilizado, a temperatura, a viscosidade, a altura da camada acima do alvo, além da interação química com as NPs geradas; para o laser: comprimento de onda, duração de pulso, energia do pulso, taxa de repetição e diâmetro do feixe (FAZIO, GÖKE, *et al.*, 2020).

Há distinção na produtividade e distribuição de tamanhos para síntese nos comprimentos de onda no visível e infravermelho (IR). Existe uma forte dependência do metal, da fluência do laser e da duração de pulso. Para altas concentrações coloidais, a maior absorção de comprimentos de onda curtos pelas partículas pode tornar a síntese de nanopartículas metálicas via LASiS em comprimentos de ondas curtos menos produtivos. Então, um laser na região do IR tem uma produtividade de ablação maior ao longo do tempo, quando comparado com lasers no visível ou ultravioleta. A intensidade do laser pode significativamente reduzir a taxa de ablação, pois deve-se levar em consideração o tipo de líquido utilizado (FAZIO, GÖKE, *et al.*, 2020).

Kim *et al.* (2014) mostraram que o comprimento de onda do laser influencia no tamanho das nanopartículas resultantes da síntese. Ao utilizar três lasers com comprimentos de onda diferentes (355, 532 e 1064 *nm*), os autores sintetizaram e caracterizaram colóides de paládio (Pd), no qual demonstraram que os menores comprimentos de onda produziram nanopartículas relativamente pequenas e mais homogêneas se comparado ao laser no IR, que

produziu maiores NPs com maior dispersão de tamanho (KIM, REDDY, *et al.*, 2014).

O coeficiente de absorção do alvo também é dependente do comprimento de onda incidente. Usualmente, quando comprimentos de onda mais curtos são utilizados, os coeficientes de absorção de materiais sólidos são maiores. A energia do pulso também influencia quase que linearmente na quantidade do material gerado (FAZIO, GÖKE, *et al.*, 2020) (PLAUTZ, 2015).

Uma maneira de procurar uma melhor produção de nanopartículas, com um possível controle de tamanho e concentração da amostra pode ser a utilização de uma radiação somatória de dois harmônicos do laser, resultando simultaneamente na síntese e processamento NPs em solução. Na literatura, há poucos artigos que relatam tal técnica. Em sua maioria, os pesquisadores utilizam o “*Double-pulse ablation (DP-LAL)*” mantendo o mesmo comprimento de onda, mas com o segundo pulso disparado com diferente tempo de atraso. Isto mostrou que nanopartículas menores foram produzidas e uma maior concentração de NPs foi obtida (DELL'AGLIO, GAUDIUSO, *et al.*, 2013) (BURAKOV, TARASENKO, *et al.*, 2005).

Utilizando dois comprimentos de onda diferentes (532 e 1064 nm), ao analisar a distribuição de cargas, é demonstrado que a radiação infravermelha produz mais íons de carga em relação à visível (TORRISI, PICCIOTTO, *et al.*, 2004), o que influencia na estabilidade coloidal. Com poucos relatos sobre o tema, e poucas variações experimentais sobre o assunto, torna-se necessário uma investigação sobre as vantagens e desvantagens da técnica, a fim de promover melhores condições experimentais na síntese de NPs via ablação a laser em solução.

2.3 Técnicas de caracterização de nanopartículas

Os avanços na nanotecnologia abriram uma nova era de diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças e lesões traumáticas. Estes nanomateriais possuem propriedades físico-químicas que têm impacto em suas interações fisiológicas (LIN, LIN, *et al.*, 2014).

Com toda uma grande gama de aplicação e uso de nanomateriais, são necessárias metodologias e protocolos para detecção e caracterização de nanopartículas, tais como tamanho, forma, propriedades de superfície, composição, pureza e estabilidade.

Muitos métodos têm sido usados para este fim, no quais são inclusas técnicas em espectroscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia eletrônica de varredura (SEM), espalhamento dinâmico da luz (DLS), ressonância magnética (EPR), espectrometria de massa (MS), espalhamento de raios-X (DRX), medidas de potencial zeta, técnicas térmicas (TGA), cromatografia, eletroforese, microscopia de força atômica (AFM), entre outros (LIN, LIN, *et al.*, 2014).

2.3.1 Espectroscopia UV-Vis

Como é visto ao longo deste trabalho, a luz interage com a matéria de maneiras diferentes. Além do efeito Raman (quando a luz é espalhada em comprimentos de ondas diferentes daquele em que a radiação monocromática é incidida), outras maneiras de interação podem ser citadas para a radiação no visível e ultravioleta: pode ser transmitida, refletida, absorvida e emitida como fotoluminescência (fluorescência e fosforescência).

A espectroscopia eletrônica acontece quando a frequência da radiação incidente corresponde a energia de transição entre dois níveis eletrônicos, a qual uma frequência específica é absorvida pelo material causando excitação de ressonância que gera uma variação na distribuição da densidade eletrônica. Então, a matéria absorve parte da radiação incidente, e é excitada a níveis de energia mais altos. Esse estado não é estável e logo retorna ao estado de equilíbrio. Os coloides preparados são colocados num equipamento, onde uma luz atinge a amostra e será direcionada a um detector. Através da relação de Lambert-Beer (Equação 16), é possível achar a relação entre concentração e absorção de um solvente (PICOLLO, ACETO e VITORINO, 2018):

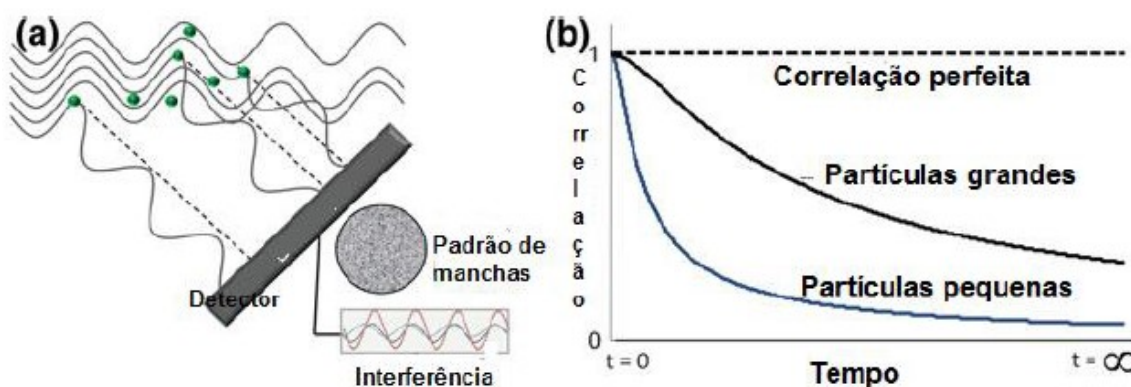
$$A = \varepsilon_{\lambda} l C \quad (16)$$

sendo A a absorvância, ε_λ é o coeficiente de absorção molar (em $L/mol \cdot cm$), l a espessura do recipiente contendo o líquido e C é a concentração molar da substância. A espectroscopia UV-Vis é uma técnica não invasiva, e que permite explicar também a coloração do coloide. A intensidade transmitida medida corresponde ao espectro resultante que é a absorção acrescida do espalhamento, denominado extinção. Para uma solução coloidal de NPs a absorção é dominada pela LSPR, cujo comprimento de onda central depende do material e do tamanho das NPs. A amplitude da extinção depende da concentração de nanopartículas na solução.

2.3.2 Espalhamento dinâmico de Luz

Para uma caracterização física de NPs, o espalhamento dinâmico de luz (do inglês *Dynamic Light Scattering - DLS*) traz a possibilidade de explorar o tamanho hidrodinâmico das partículas, bem como sua forma, estrutura e agregação. O DLS, sendo uma técnica bem popular em diferentes modalidades, traz a vantagem de ser uma técnica não invasiva e de curta duração. Este procedimento usa a relação de dependência do movimento da partícula com o seu tamanho. O DLS monitora a flutuação temporal da intensidade do espalhamento elástico da luz (espalhamento *Rayleigh*) induzido pelo movimento browniano das partículas de tamanho muito menor que o comprimento de onda de luz incidente, em um ângulo de espalhamento fixo (LIN, LIN, *et al.*, 2014).

Figura 8 - Esquema de interação da luz com as nanopartículas coloidais em movimento Browniano, fundamento da técnica de DLS



Fonte: BARCIKOWSKI, AMENDOLA, *et al.* (2016)

Na Figura 8, em (a) observa-se que a luz espalhada produz padrões de interferência variáveis no tempo. Em (b) estes padrões obedecem a uma função de correlação que pode ser associada a um modelo matemático (Equação 17) do qual se pode determinar a distribuição de tamanhos das nanopartículas (THALER, 2020).

$$D_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (17)$$

onde D_H é a constante de difusão, $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} J/K$ (constante de Boltzman), T a temperatura, η a viscosidade do solvente e r o raio da partícula.

2.3.3 Microscopia de Força Atômica

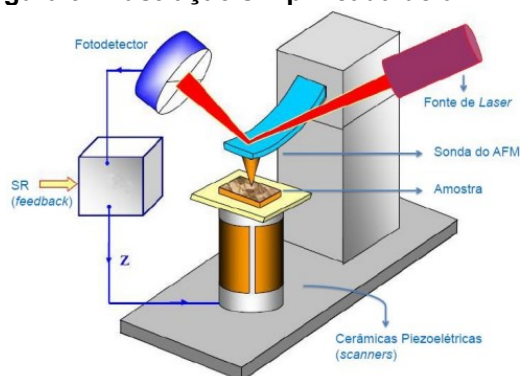
A técnica de microscopia de força atômica (do inglês *Atomic Force Microscopy* - AFM) permite ver com uma riqueza de detalhes a superfície de uma amostra na escala nanométrica. Através dela podem ser geradas imagens de todo tipo de estrutura de material (mole ou dura), sendo a amostra sintética ou natural. É possível ver inclusive moléculas e até mesmo arranjo de átomos individuais, com detalhes tridimensionais (3D) (EATON, WEST, 2010, HAUGSTAD, 2012).

Desde sua invenção, a microscopia de força atômica tornou-se uma ferramenta essencial para pesquisas no âmbito material como biológico. Em grande parte dos centros de pesquisas e universidades têm-se um AFM disponível em um laboratório. Este método ajuda na caracterização e medição em diversos estudos.

O AFM permite gerar imagens de diversos tipos de materiais independentemente da opacidade ou condutividade. A morfologia da superfície não é percebida da maneira usual, ou seja, por linha de visão, reflexos ou sombras. O equipamento, em cada ponto ou pixel dentro de uma matriz 2D sobre a superfície, faz uma medição da altura da superfície usando uma “sonda” de força sólida. Essencialmente, utiliza-se o toque para criar imagens, ao contrário dos microscópios de luz ou eletrônicos (HAUGSTAD, 2012).

Quando a ponta do AFM se aproxima da amostra, a mesma interage com a superfície da amostra, como ilustrado na Figura 9. Ao longo da varredura, a haste sofre deflexões por causa de forças de interação (eletrostática), desviando o laser que incide sobre ele. O cantiléver deflete também devido as forças do tipo van der Waals. O laser é detectado por um fotodiodo que envia informações de desvio da haste para o controle de realimentação que ajusta a posição da amostra (e/ou da ponteira) e para o computador onde é construída a topografia digitalizada da superfície da amostra.

Figura 9 - Ilustração simplificada de um AFM



Fonte: ALMEIDA (2018)

Há três modos de operação do AFM: contato (domínio de forças repulsivas), não-contato (domínio de forças atrativas) ou semicontato (domínio de ambas). A técnica tem o poder de analisar tamanho, distribuição, forma, estrutura, dispersão, agregação e propriedades de superfície, através de mapas em 3D, topografia com escala sub-nanométrica, e amostras secas, ou em soluções aquosas. Apesar disso, as limitações da técnica superestimam as dimensões laterais, a amostragem demanda grande tempo de aquisição (LIN, LIN, *et al.*, 2014).

2.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A técnica mais usada para caracterização de nanomateriais é o microscópio eletrônico de transmissão (do inglês *transmission electron microscopy - TEM*), que permite uma resolução espacial com dimensões de

$< 1 \text{ nm}$. Esta técnica faz com que um feixe de elétrons de alta voltagem (10 – 200 *kV*) interaja com um espécime cortado em espessuras muito finas. A amostra é atingida, e o feixe atravessa o material. Os elétrons são transmitidos e projetados em um dispositivo de aquisição de imagens. A imagem é feita a partir do contraste de amplitude, fase ou sombra de escuridão variável de acordo com a densidade de elétrons não dispersos (LIN, LIN, *et al.*, 2014).

A partir desta imagem, é possível medir a distribuição de tamanho das nanopartículas e verificar sua morfologia. Porém, deve ser levado em consideração que apenas uma pequena população desta amostra é selecionada para medição nesta técnica, o que pode subestimar/superestimar o resultado global.

Uma das aplicações desse dispositivo é a possibilidade de, via difração de elétrons em área selecionada (SAED – *Surface Area Electron Diffraction*) (NADAS, 2019), calcular distâncias interplanares do material analisado, permitindo assim a caracterização da estrutura cristalina das nanopartículas, pois está, de certa forma, se observando o espaço recíproco da rede.

2.3.5 Potencial zeta

A medição do potencial zeta dá a possibilidade de aferir a carga superficial de NPs em solução coloidal. Pode-se interpretar os resultados das medições como mostra a Tabela 2. A vantagem desta técnica é que é possível, via ELS (*electrophoretic light scattering* - espalhamento de luz eletroforético), a medição simultânea de muitas partículas. Porém, apresenta desvantagens como efeito eletro-osmótico² e falta de precisão e repetibilidade.

² É um efeito eletrocinético que envolve a movimentação da solução *bulk* contra uma superfície sólida carregada sob a influência de um campo elétrico (LI e WU, 2003).

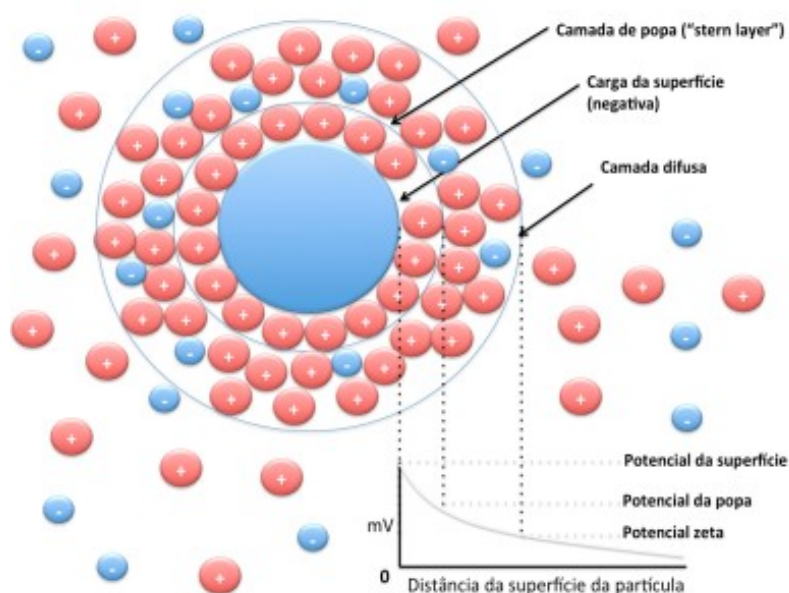
Tabela 2 - Comportamento de estabilidade de coloides baseados no valor do potencial zeta
“Comportamento” de
estabilidade

Valor do potencial zeta (mV)	“Comportamento” de estabilidade
0 até ± 5	Floculação ou coagulação
± 10 até ± 30	Instabilidade incipiente
± 30 até ± 40	Estabilidade moderada
± 40 até ± 60	Boa estabilidade
Maior que ± 60	Excelente estabilidade

Fonte: KUMAR, DIXIT (2017)

A superfície de uma partícula carregada está firmemente ligada a íons de cargas opostas, ao qual forma-se uma fina camada chamada de Stern, envolta de uma camada externa constituídas de íons fracamente associados, como ilustrado na Figura 10. Impulsionada pelo movimento browniano, a partícula carregada, ao mover-se, isola os íons que migram com a partícula de carga na camada difusa de íons que permanecem com o dispersante em massa fora da camada. O potencial elétrico na superfície de cisalhamento é chamado de potencial zeta, que é determinado através da medição da velocidade da partícula enquanto a solução de nanopartículas é submetida a um campo elétrico (LIN, LIN, *et al.*, 2014).

Figura 10 - Representação esquemática do potencial zeta



Fonte: ZMBERLAN (2018)

2.4 Antibióticos e suas classes

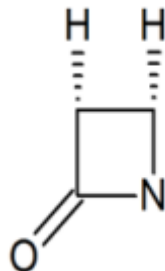
Por definição, antibióticos são substâncias que são capazes de agir como tóxicos seletivos sobre outros microrganismos. Sua produção pode ser advinda de microrganismos, vegetais e, até, pelo próprio organismo animal, ou por processos de modificação sintética gerando novos antibióticos. São separados por classes, organizados quanto ao espectro de ação, estrutura química ou efeito sobre os microrganismos (MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.*, 2019).

Particularmente, neste trabalho serão apresentados os antibióticos (aos quais foram selecionados) a partir de seu mecanismo de ação, divididos em: Beta lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e glicopeptídeos.

I. β -lactâmicos:

Esta é a principal classe de antibióticos utilizado na prática clínica. Os antibióticos pertencentes a este grupo possuem um mesmo núcleo estrutural: o anel β -lactâmico. Sua estrutura é composta por três átomos de carbono e um de nitrogênio, como ilustrado na Figura 11:

Figura 11 - Anel beta-lactâmico



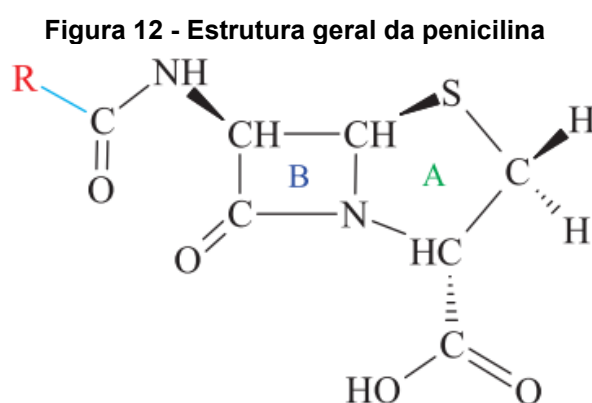
Fonte: ARAÚJO, AZEVEDO (2020)

O mecanismo de ação deste grupo age na parede celular dos germes sensíveis, impedindo que as camadas de peptidoglicano mantenham-se estáveis, tornando a bactéria mais susceptível à lise osmótica.

Os representantes desta classe no presente trabalho estão divididos em outras três subclasses:

i. Penicilina:

As penicilinas são produzidas pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, e são um dos primeiros antibióticos a serem utilizados em tratamentos em humanos, sendo utilizadas até hoje. As penicilinas naturais são escolhidas para tratar infecções causadas por bactérias como estreptococo, pneumococo sensível, *Treponema pallidum*, sífilis não neurológicas, *S. aureus*, meningite, etc. São bem toleradas, tendo a hipersensibilidade como efeito mais comum (MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.*, 2019). Sua estrutura geral está representada na Figura 12:



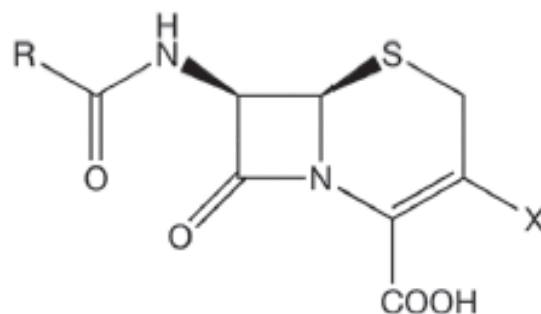
Fonte: CALIXTO, CAVALHEIRO (2012)

Sua composição consiste em um anel tiazolúrico (A) ligado a um anel β -lactâmico (B), ao qual se fixa uma cadeia lateral (R). Esta cadeia lateral que irá distinguir um tipo específico de penicilina, trazendo características quanto a farmacologia e propriedades antibacterianas (CALIXTO, CAVALHEIRO, 2012).

ii. Cefalosporina:

Em 1948 as cefalosporinas são antibióticos inicialmente extraídas do fungo *Cephalosporium acremonium*. Graças ao amplo espectro de ação, baixa toxicidade e facilidade na administração, as cefalosporinas tem um grande uso na medicina. Em sua composição, há um núcleo formado pelo ácido 7-aminocefalosporânico, um sistema de anel di-idrotiazina betalactâmico, como representado na Figura 13:

Figura 13 - Estrutura geral das cefalosporinas



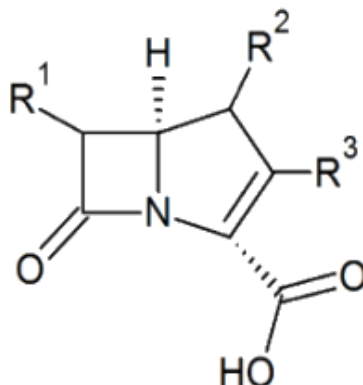
Fonte: MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.* (2019)

iii. Carbapenênicos:

Em um combate a bactérias multirresistentes, a última opção terapêutica são os carbapenênicos. Estes apresentam um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Como não são degradados pelas peptidases renais, o medicamento não produz toxicidade renal. São derivados da tienamicina (antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces cattleya*) (AZEVEDO, 2014, MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.*, 2019).

Possuem ação inibitória da parede bacteriana, inibindo a etapa final da transpeptidação da síntese peptidoglicana nas paredes celulares da bactéria. Possuem um amplo espectro de ação (FIGUEREDO, FREITAS, *et al.*, 2021). Representados na Figura 14 sua estrutura geral:

Figura 14 - Estrutura molecular dos carbapenênicos

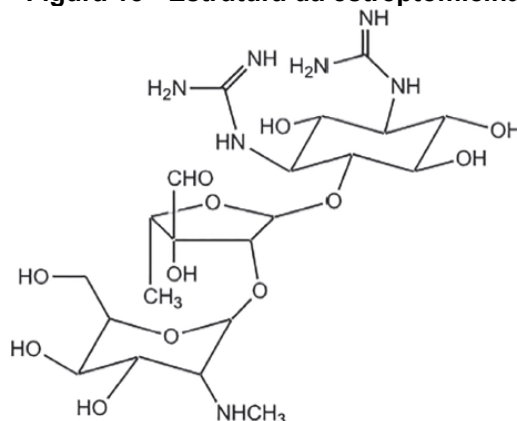


Fonte: ARAÚJO, AZEVEDO (2020)

II. Aminoglicosídeo:

Esta classe de ATBs apresenta o aminociclitol em sua estrutura, além de ser formada por açúcares e grupo amina, como ilustrada na Figura 15. A partir do isolamento do *Streptomyces griseus*, em 1944, foi sintetizado o primeiro representante desta classe, a estreptomicina, o qual foi o segundo antibiótico descoberto com ação sistêmica, que iniciou o tratamento para a tuberculose. São fármacos muito utilizados na prática hospitalar, mas apresentam elevadas nefrotoxicidade e ototoxicidade (MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.*, 2019).

Figura 15 - Estrutura da estreptomicina

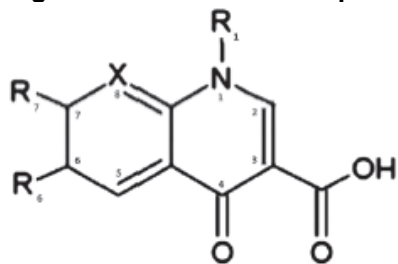


Fonte: MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.* (2019)

III. Quinolona:

Os antibióticos da classe das quinolonas são formados por um núcleo bicíclico, que inclui um grupo carboxílico, uma carbonila e um átomo de azoto. Sua estrutura está representada na Figura 16. O ácido nalidíxico (subproduto da cloroquina) foi a primeira quinolona disponibilizada para o tratamento de infecções urinárias. Após um tempo foi disponibilizado o uso das quinolonas fluoradas (ciprofloxacino e norfloxacino). Há uma grande gama de tratamentos antimicrobianos com o uso das quinolonas, mas diversos fármacos foram retirados de circulação após efeitos colaterais serem descobertos. Com o aumento das cepas resistentes, novas quinolonas foram surgindo, então, houve-se a necessidade de dividi-las em gerações a partir de 1997 (MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.*, 2019).

Figura 16 - Estrutura das quinolonas



Congêneres	R1	R6	R7	X
Ciprofloxacino		-F		-CH-
Ofloxacino		-F		-CH-
Levofloxacino		-F		
Gemifloxacino		-F		-N-

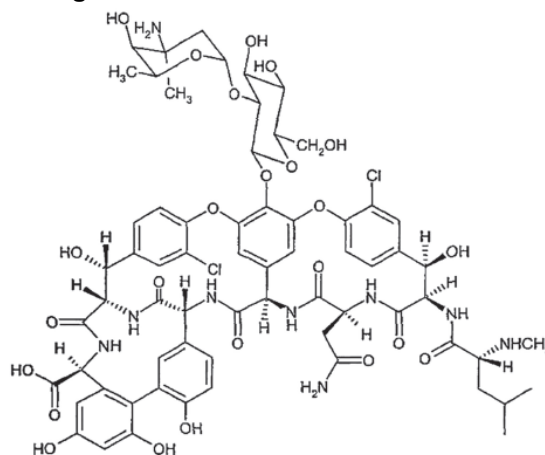
Fonte: MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.* (2019)

IV. Glicopeptídeo:

Com o isolamento da *Amycolatopsis orientalis* por volta de 1950, tem-se a liberação da vancomicina, primeiro fármaco representante desta classe, e ao final da década, utilizou-se como um agente importante para o tratamento de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina. Inicialmente, os componentes desta formulação eram muito tóxicos, o que fez com que o uso desses fármacos fosse reduzido. Mas com o desenvolvimento da ciência e tecnologia, o processo de fabricação da droga permitiu uma síntese mais purificada, conseqüentemente menos tóxica (MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.*, 2019). Moléculas de açúcares e compostos de vancosamina são ligas à uma cadeia de peptídeos, representada na Figura 17, que ilustra a grande molécula da vancomicina.

Devido ao seu tamanho, ela se torna praticamente sem atividade contra gram-negativas.

Figura 17 - Estrutura da vancomicina

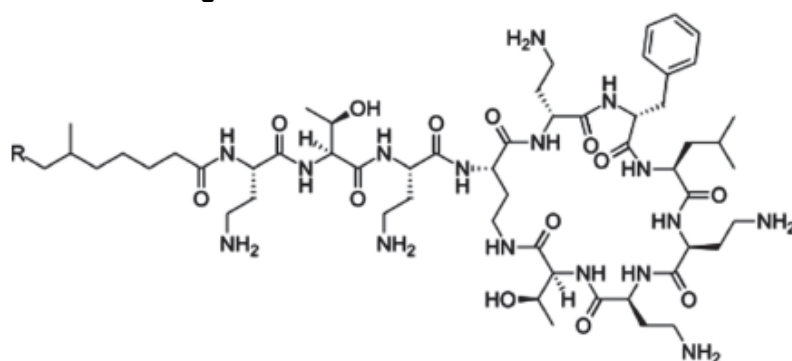


Fonte: MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.* (2019)

V. Polimixina:

A classe das polimixinas tiveram suas descobertas a partir da estrutura da *Bacillus polymyxa* e *colistin* na década de 1940. Utilizadas até 1980 devido à alta taxa de nefrotoxicidade (potencial risco de causar lesão nos rins). São formadas por uma grande estrutura decapeptídica policatiônica cíclica, têm uma alta quantidade da molécula de ácido 2,4-diaminobutírico; além disso, um composto graxo ligado por amida ao peptídeo, como mostra a Figura 18:

Figura 18 - Estrutura da Polimixina B



Fonte: MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.* (2019)

Na classe das polimixinas, estão as polimixinas A, B, C, D e E, sendo apenas a polimixina B e E que tem uso atual no ambiente intra-hospitalar. Apesar da polimixina E apresentar potencial nefrotóxico inferior ao da B, a ação bactericida da polimixina B é mais expressiva (NEIVA, FONSECA, *et al.*, 2013). Sua ação é sobre bactérias gram-negativas (MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.*, 2019).

2.5 Resistência aos antimicrobianos

Um dos grandes problemas de saúde pública é a resistência antimicrobiana, pois leva a diminuição da eficácia dos antibióticos, que gera um aumento nos custos hospitalares, aumento de taxas de hospitalização e morbimortalidade de uma população afetada (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020).

Diversos fatores são responsáveis pela resistência, incluindo a aquisição de genes de resistência, pressão seletiva e disseminação clonal. Nos últimos 10 anos, o aumento do uso inadequado e descontrolado de antibióticos na prática clínica e na agroveterinária é amplamente considerado como a principal causa da disseminação da resistência entre os microrganismos (MARANGONI, 2022).

Resistência antimicrobiana é a capacidade de microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas, de resistirem aos efeitos dos medicamentos antimicrobianos, tornando-os ineficazes no tratamento de infecções. Pode-se classificar em dois tipos de resistência: resistência natural e resistência adquirida.

A resistência natural é inerente à bactéria e é determinada por sua estrutura celular e características bioquímicas. Por exemplo, algumas bactérias gram-negativas possuem uma camada externa que impede a entrada de certos antibióticos. Já a resistência adquirida é advinda pela bactéria após exposição a um antibiótico, que pode ser causada por mutações genéticas ou pela transferência de genes de resistência de outras bactérias. A resistência adquirida pode se espalhar rapidamente por meio da seleção natural e da transferência

horizontal de genes, tornando-se uma grande ameaça para o tratamento de doenças infecciosas (TAVARES, 2000).

Existem diversos mecanismos pelos quais os microrganismos podem se tornar resistentes aos antimicrobianos. Um dos mais comuns é a mutação genética, que pode alterar a estrutura ou a função da proteína alvo do antibiótico. Além disso, os microrganismos podem produzir enzimas que inativam o antibiótico, ou bombas de efluxo que impedem a entrada do composto na célula. Outros mecanismos incluem a alteração da membrana celular e a mudança no número ou na afinidade dos locais de ligação do antibiótico. A resistência também pode ser adquirida por transferência horizontal de genes, como plasmídeos que carregam genes de resistência entre diferentes espécies bacterianas (MACHADO, PATROCÍNIO, *et al.*, 2019).

Diante da batalha em curso entre antibióticos e bactérias, é fundamental utilizar uma abordagem multidisciplinar para elaborar estratégias que possam controlar e combater a resistência bacteriana.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados na produção e caracterização das nanopartículas, bem como o processo que levará a obtenção do espectro Raman/SERS dos antibióticos.

3.1 Seleção e preparação dos antibióticos

Dentre os fármacos relevantes e que precisam ser monitorados, juntamente com o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, foram selecionados os seguintes antibióticos para análise no presente trabalho: Ampicilina (β -lactâmico - Penicilina), Ceftazidima (β -lactâmico - Cefalosporina), Meropenem (β -lactâmico - Carbapenêmico), Vancomicina (Glicopeptídeo), Ciprofloxacino (Quinolona) e Gentamicina (Aminoglicosídeo). Tais medicamentos foram escolhidos pois são os mais utilizados na terapia intensiva.

Neste trabalho foi utilizado o insumo farmacêutico ativo (também denominado fármaco, ou princípio ativo) que é o componente farmacologicamente ativo destinado ao emprego em medicamento, não o medicamento em sua forma comercial. Foram disponibilizados 2 mg de cada medicamento devido ao seu alto custo. As características de cada fármaco estão presentes na Tabela 3.

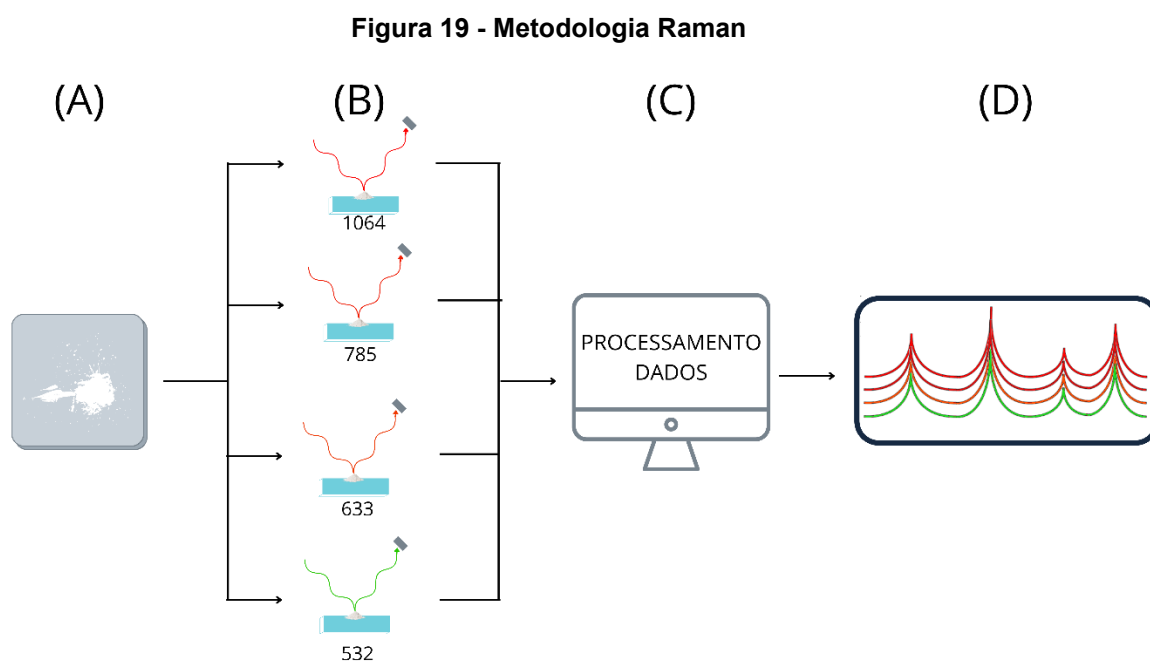
Tabela 3 - Seleção de fármacos

Antibióticos	Classe	Código	Lote	Pureza (%)	Conteúdo de água	Peso molecular (certificado de análise)	*Preço/g
Ampicilina	β -lactâmico	A0166	089M4784V	-	0,050	371,39	67,80
Ceftazidima	β -lactâmico	C3809-1G	019M4859V	98,4	0,124	546,58	1533,00
Meropenem	β -lactâmico	Y0001252	-	86,9	0,123	437,51	1256,00
Gentamicina	Aminoglicosídeo	G3632-5G	019M4857V	-	-	477,60	642,00
Polimixina B	Aminoglicosídeo	P0972-1MU	069M4148V	84,7	0,007	1385,61	518,00
Ciprofloxacino	Quinolona	PHR1044-1G	LRAB3671	94,0	0,059	385,82	561,00
Vancomicina	Glicopeptídeo	-	079M4001V	100,0	0,030	1485,71	387,00 (10 ml)

*Cotação realizada no dia 08 de abril de 2023
Fonte: o autor (2023)

3.2 Espectroscopia Raman

Foi depositado em uma lâmina de vidro 1 μg de cada antibiótico (em pó), posteriormente a lâmina foi colocada no espectrômetro, focalizando o laser no alvo a fim de se obter os espectros Raman dos antibióticos puros. Primeiramente, utilizando o *laser* na faixa do IR, para os comprimentos de onda 785 nm e 1064 nm , como ilustrado na Figura 19.



(A) – Deposição de 1 μg do ATB em pó em uma lâmina de vidro. (B) – Interrogação da amostra no espectrômetro (comprimento de onda do laser em nm). (C) – Processamento de dados espectrais em *software* de análise de dados. (D) – Obtenção dos espectros Raman do ATB.

Fonte: o autor (2023)

O espectrômetro utilizado foi o modelo Cora 5001 – Anton Paar (Figura 20) com resolução (para 785 nm) de $6\text{ cm}^{-1} - 9\text{ cm}^{-1}$ e resolução (para 1064 nm) de $12\text{ cm}^{-1} - 17\text{ cm}^{-1}$, operando em 785 nm (IR) e 1064 nm (IR) com potência entre 0 mW e 450 mW . Medidas foram feitas com tempos de aquisição entre 1 e 10 s e variados números de acumulações de espectros para as diferentes moléculas analisadas.

Figura 20 - Espectrômetro Cora 5001

Fonte: Anton Paar

Para os espectros no visível, foi utilizado o microscópio Raman confocal *Witec alpha 300R* (Figura 21), disponível no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) – da Universidade Federal do Paraná (UFPR), cuja fotografia é apresentada na Figura 21. Este equipamento com estágio para posicionar a amostra com resolução lateral de 200 nm , resolução vertical de 500 nm . Utilizando os lasers 532 nm e 633 nm , com dois espectrômetros com resolução de $0,02\text{ cm}^{-1}$. O tempo de aquisição foi ajustado entre $0,1$ e 10 s e foram utilizados diferentes números de acumulação.

Figura 21 - Microscópio Raman Witec alpha 300R

Fonte: Witec

Vale ressaltar que as medidas Raman/SERS realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME), ao qual este equipamento pertence, foram feitas em época de pandemia da Covid-19. Devido aos protocolos de segurança adotados pelo laboratório, as medidas não podiam ser

acompanhadas presencialmente pelo solicitante, somente acompanhadas virtualmente.

Quanto ao processamento dos dados espectrais, foi utilizado um *software* OriginLab de análise de dados, com métodos matemáticos a fim de se obter “espectros limpos”, nos quais os modos vibracionais da assinatura espectral são ressaltados. Os espectros “brutos” exibem claramente a presença de uma mudança de linha de base e raios cósmicos. O pré-processamento do conjunto de dados brutos inclui calibração de linha de base, utilizando o método de suavização de mínimos quadrados assimétricos, e remoção de raios cósmicos com base no método de detecção de pico anormal. A remoção de ruído será feita usando suavização (*smooth*), a qual utiliza o método de convolução Savitzky-Golay.

Para o espectro Raman intensificado, SERS, os experimentos foram feitos também utilizando um espectrômetro Andor Shamrock SR – 224 303i, descrito na seção 3.4.

3.3 Síntese e caracterização de nanopartículas

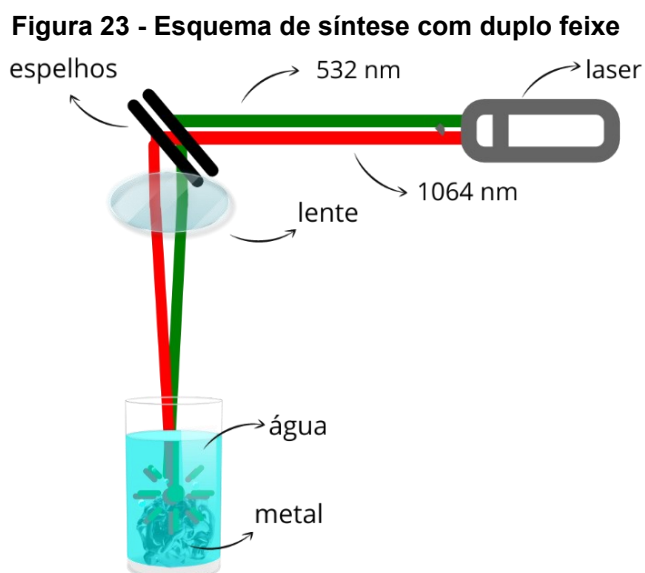
As nanopartículas foram sintetizadas pela técnica de ablação a laser em solução, descrita na seção 2.2. Modelo Brilliant B (Figura 22), operando nos comprimentos de onda de 1064 nm e 532 nm, Q-switched em 338 μ s, entregando pulsos de 5 ns com energia total de 220 mJ (sendo 200 mJ para o IR e 20 mJ para o verde) e uma fluência de $2,83 \cdot 10^7$ J/m² em um feixe com cintura de 30 μ m.

Figura 22 - Laser Brilliant B



Fonte: Brilliant

O laser opera com taxa de repetição de 10 Hz e tem uma incidência de 45° em dois espelhos (para ambos os comprimentos de onda) que refletem em uma lente de distância focal de 40 cm antes de chegar no alvo. A esquema da montagem está demonstrada na Figura 23:



Fonte: o autor (2023)

Para tentar padronizar a síntese dos coloides, procurou-se manter uma coluna de água pura de 2 cm acima do alvo metálico. Com isso, o tempo de ablação se manteria proporcional para cada alvo. Aqueles alvos que tinham uma quantidade de água de 8 ml, foram bombardeados por 3 minutos. Já alvos maiores, que necessitaram de um copo béquer maior, tiveram que ser submersos em uma maior quantidade de água, logo, o tempo de ablação adotado foi aumentado proporcionalmente. Na Tabela 4 a metodologia da síntese está explicitada:

Tabela 4 - Metais para síntese

Alvo	Béquer (ml)	Água (ml)	Tempo
Au	10	8	3 min
Ag	30	15	5 min 38 s
Co	10	8	3 min
Cu	30	15	5 min 38 s
Fe	30	15	5 min 38 s

Fonte: o autor (2023)

Com a finalidade de investigar a contribuição de cada harmônico do laser (de forma separada e conjunta (*double pulse wavelength*) para a síntese de NPs, para cada alvo serão feitas três ablações, resultando em três lotes (LA, LB e LC). Segue-se:

- LA: Irradiar o alvo com ambos os comprimentos de onda incidindo ao mesmo tempo.
- LB: Irradiar o alvo com o 532 nm colocando na frente do feixe um espelho dicróico para desviar o 1064 nm, antes de chegar no alvo;
- LC: Irradiar o alvo com o 1064 nm colocando na frente do feixe um espelho dicróico para desviar o 532 nm, antes de chegar no alvo;

Para a caracterização das NPs, foram utilizadas as técnicas de caracterização descritas na seção 2.3:

- UV-Vis: espectrômetro *Ocean Optics Model USB 2000+* (Figura 24), com faixa de operação entre 200 nm e 1000 nm e resolução de 0,9 nm foi utilizada para realização das medidas. Foram colocados 2 ml dos coloides em uma cubeta para a medição. As amostras não foram diluídas. O equipamento está disponível no laboratório Fotonanobio (UTFPR).

Figura 24 - Espectrômetro Ocean Optics USB 2000+



Fonte: Ocean Optics

- DLS: equipamento *Microtrac Nanotrac Ultra* (Figura 25), cuja operação foi realizada em 2 ml do coloide de nanopartículas. O equipamento está disponível no laboratório Fotonanobio (UTFPR).

Figura 25 - DLS Microtrac Nanotrac Ultra



Fonte: Microtrac

- AFM: As imagens de AFM foram adquiridas em modo fase no equipamento *SPM-9700 HT* da *Shimadzu* (Figura 26), utilizando a ponta NCHR do fabricante *NanoWorld* (constante de força 42 N/m e frequência de ressonância de 320 kHz). A área de varredura foi de $3 \times 3\ \mu\text{m}^2$, velocidade de scan $0,8\text{ Hz}$, resolução de $256 \times 256\text{ pixel}$, *P gain* de $0,001$, *I Gain* de 1500 e *operating point* de $0,2\text{ V}$. Uma gota de aproximadamente $5\ \mu\text{l}$ de cada coloide é depositada numa lâmina de silício para fazer as medidas. O equipamento está disponível no laboratório LAMAQ (UTFPR).

Figura 26 - AFM SPM-9700 HT



Fonte: o autor (2023)

Para análise estatística da amostra foi utilizado os *softwares* Scanning Probe Microscope (SPM-9700) da Shimadzu e WSxM 4.0 da Nanotec Eletrônica (HORCAS, FERNANDEZ, *et al.*, 2007).

- TEM: imagens adquiridas com o Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo *JEOL JEM 1200EX-II* (Figura 27). Tensão

entre 80 *kV* e 100 *kV*, resolução para imagem de ponto: 0,45 *nm*, resolução de linha: 0,20 *nm*, faixa de magnificação: 5000x a 500000x. O equipamento está disponível no CME (UFPR).

Figura 27 - JEOL JEM 1200EX-II



Fonte: JEOL

Para a análise das imagens obtidas pelo TEM, foi utilizado o software ImageJ, e o tratamento de dados foi feito no Microsoft Excel.

- Potencial zeta: medido com analisador do tamanho de partículas modelo *Litesizer 500* (Figura 28), princípio ELS (dispersão de luz eletroforética), faixa de medição ≥ 1000 *mV*. 2 *ml* de cada coloide foi colocado em uma cubeta para a medição. O equipamento estava disponível no laboratório Fotonanobio (UTFPR), a empréstimo da Anton Paar.

Figura 28 - Litesizer 500



Fonte: Anton Paar

Os tratamentos dos dados do UV-Vis, DLS e potencial zeta foram feitos utilizando o software OriginLab.

3.4 Espectros SERS

Nos locais de maior concentração do campo elétrico há uma maior intensificação do sinal de espalhamento Raman. Como a cobertura de NPs, bem como do analito tendem a não ser uniformes, numa lâmina, tanta para o mapa, quanto para medidas singulares, foram tomados pontos de interrogação de maneira exploratória.

Os dados de espectroscopia SERS foram obtidos em dois espectrômetros distintos. O primeiro equipamento será o mesmo já utilizado para a obtenção do espectro Raman, qual seja, o equipamento disponível no CME (Witec Alpha 300R). Para o processamento de dados dos espectros SERS, a mesma metodologia aplicada anteriormente nos gráficos referentes ao sinal Raman aqui também é utilizada. Para este equipamento, a obtenção dos mapas foi através da extensão WITio para o *software* MatLab.

Também foram realizadas medidas com o espectrômetro disponível no Laboratório LabNS da UFMG. O equipamento corresponde ao modelo Andor Shamrock SR – 224 303i (Figura 29), com resolução de 5 cm^{-1} , operando em 633 nm (visível) com potência entre $1,959\ \mu\text{W}$ e $20,51\text{ mW}$, objetiva a óleo de $60\times$ ($NA = 1,4$). Diferentes tempos de aquisição e números de acumulações de espectros foram utilizados para as diferentes moléculas analisadas. Além disso, foram empregadas diferentes potências para a mesma amostra, com a finalidade de obter-se o espectro com a mais baixa potência possível. Os mapas medidos neste equipamento foram obtidos pelo software FabNS PortoFlow.

Figura 29 - A) Espectrômetro Andor Shamrock. B) Amostra no equipamento



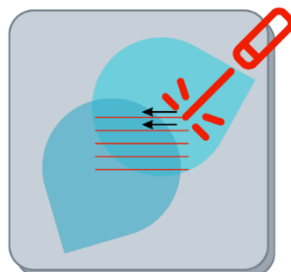
Fonte: o autor (2023)

Semelhantemente ao processo do espectro Raman, para análise do sinal em baixas concentrações, a amostra foi diluída com água pura em concentrações de aproximadamente 5 *mM*, sendo depositado em uma lâmina de vidro 1 μl da solução e adicionado 1 μl de NP (gota-a-gota). Diferentes NPs foram usadas para verificação da afinidade das mesmas com o antibiótico.

Particularmente com as NPs de cobalto, que são magnéticas, foram feitos substratos mais homogêneos, seguindo a metodologia realizada por (THALER, 2020), onde 1 μl de NP é depositado na lâmina de vidro, com um ímã em baixo, a fim de se obter uma melhor distribuição do material. Após o secamento, a solução com ATB é depositada.

Com este equipamento será possível fazer mapas Raman, logo, a deposição no vidro será feita de tal maneira que as duas gotas (solução e NP) sejam pingadas em locais diferentes, mas com uma região de intersecção, como mostra a Figura 30. Dependendo da coloração, tanto do analito, quanto das NPs, esse processo é dificultado.

Figura 30 - Gota-a-gota para mapa Raman



Fonte: o autor (2023)

O espectrômetro percorre áreas de 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ e 50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$, com tempo de integração de 1 *ms*, e potência a ser determinada para cada amostra. O caminho que o espectrômetro percorre foi unidirecional, de modo que não houve duas medidas no mesmo ponto.

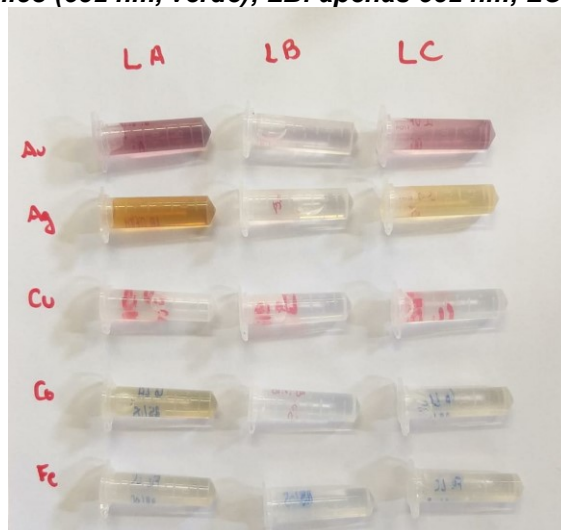
4 RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados deste trabalho, acompanhados de uma discussão de cada experimento.

4.1 Síntese de NPs por LASiS e caracterização

O coloide das nanopartículas ao serem irradiadas com ambos os comprimentos de onda (LA) apresentaram uma coloração mais forte, se comparado quando irradiadas por cada harmônico separadamente (LB e LC), como observado na Figura 31. Nota-se também que o coloide irradiado com 532 nm (LB) apresentou uma menor concentração, deixando a amostra com uma coloração mais “fraca”. Em relação ao irradiado apenas com o comprimento de onda fundamental em 1064 nm (LC) a intensidade da coloração da amostra é intermediária.

Figura 31 - Suspensões coloidais - *double wavelength pulse*, Amostras de Au, Ag, Cu, Co e Fe; LA: sintetizadas com comprimento de onda fundamental (1064 nm, infravermelho) e primeiro harmônico (532 nm, verde); LB: apenas 532 nm; LC apenas 1064 nm.



Fonte: o autor (2023)

Como a “intensidade da cor”, característica macroscópica da amostra que é relacionada à homogeneidade na distribuição de tamanhos e também está associada a concentração de nanopartículas, o lote LA (Figura 32) foi escolhido para realização dos experimentos para obtenção dos espectros SERS.

Figura 32 - Suspensões coloidais (LA)

Fonte: o autor (2023)

A relação de concentração e indiretamente “intensidade da cor” da amostra é dada pela lei de Beer, já apresentada na Equação 16, e será discutida nas seções subsequentes.

Além dos coloides citados anteriormente, foram utilizadas NPs de vanádio. Essas amostras, particularmente, foram sintetizadas no âmbito do projeto de teste de biosensores pela aluna Daniele Laskowski, bolsista de Iniciação Científica e pesquisadora do laboratório Fotonanobio. Seguindo os mesmos parâmetros das demais NPs deste trabalho, resultou-se na solução coloidal apresentada na Figura 33. Essas NPs também foram utilizadas para medição de espectros SERS.

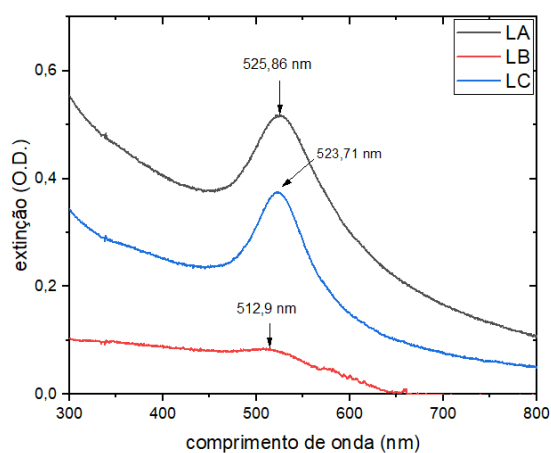
Figura 33 - Suspensão coloidal (VNP)

Fonte: o autor (2023)

4.1.1 UV-Vis e potencial zeta

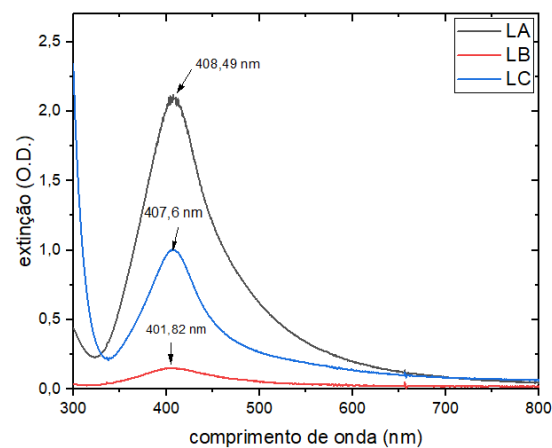
A Figura 34 mostra a variação do espectro de absorção do colóide de ouro quando a concentração de nanopartículas varia conforme o tipo de ablação feita. É possível verificar que a absorbância é mais alta quando as nanopartículas são sintetizadas com o laser operando nos dois comprimentos de onda (LA), em contraste com o laser operando somente no 532 nm (LB). Este comportamento se apresentou em todos os colóides (ilustrados nas Figuras 35, 36, 37 e 38).

Figura 34 - Extinção de colóides de AuNP



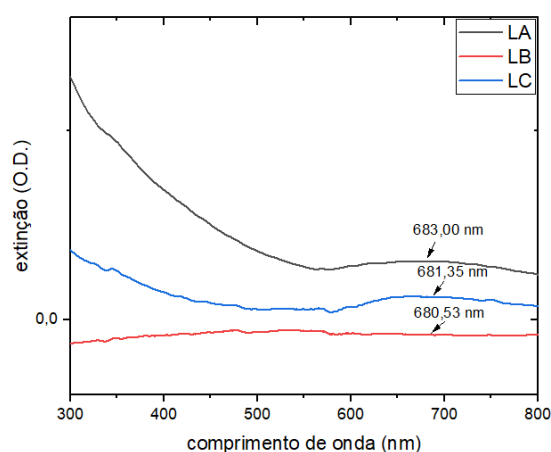
Fonte: o autor (2023)

Figura 35 - Extinção de colóides de AgNP



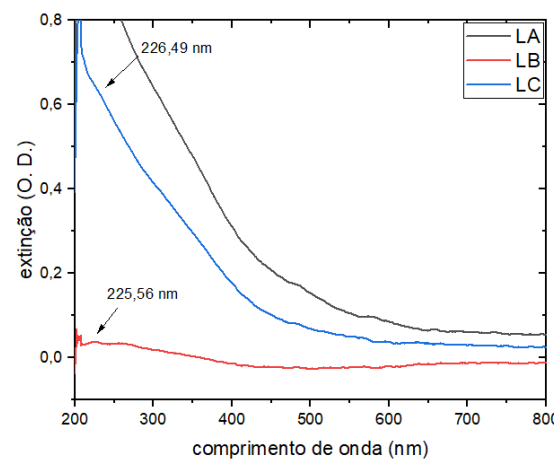
Fonte: o autor (2023)

Figura 36 - Extinção de colóides de CuNP

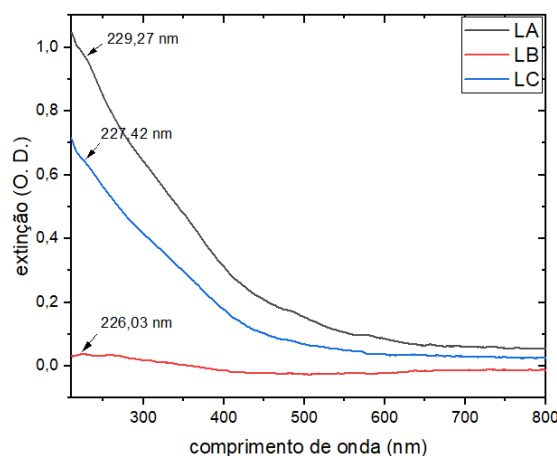


Fonte: o autor (2023)

Figura 37 - Extinção de colóides de CoNP



Fonte: o autor (2023)

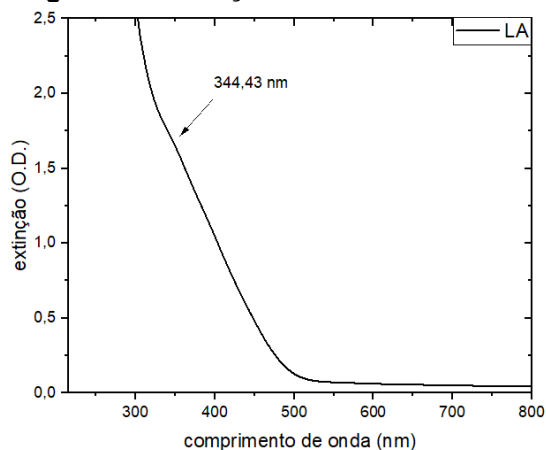
Figura 38 - Extinção de coloides de FeNP

Fonte: o autor (2023)

Para os casos da prata e do ouro, fica perceptível (Figuras 34 e 35) também que há um deslocamento do pico da LSPR na sequência LA, seguido de LC e depois LB. Este mesmo comportamento não ficou evidenciado nos outros coloides.

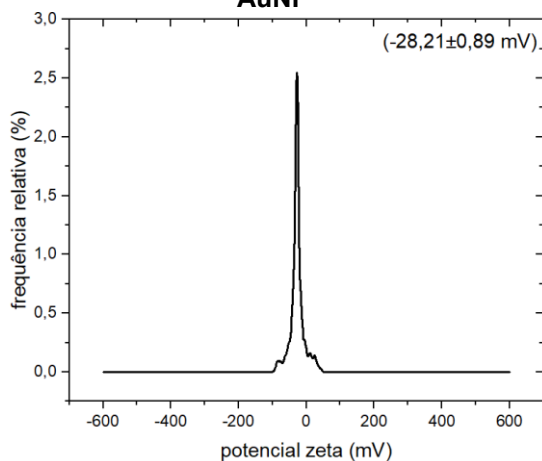
Outro fato interessante é que os resultados concordam com a literatura, pois a taxa de produção dos lotes LC, feitas com laser no IR (1064 nm) foi maior se comparadas ao laser no visível (532 nm). Consequentemente, a taxa de reprodução somando os dois harmônicos foi maior ainda, já que a energia total é somada. Quanto a absorvância ser dependente do comprimento de onda o resultado não foi conclusivo, visto que a energia do pulso em 532 nm é 10 vezes menor do que a do IR, os resultados se apresentaram contrários ao teórico.

Como as nanopartículas de vanádio não estavam inseridas no plano de trabalho desta pesquisa, não foi feita uma produção seriada de NPs utilizando os harmônicos do laser individualmente, somente o laser com os dois comprimentos de onda. Para tal coloide, segue na Figura 39 o gráfico UV-Vis:

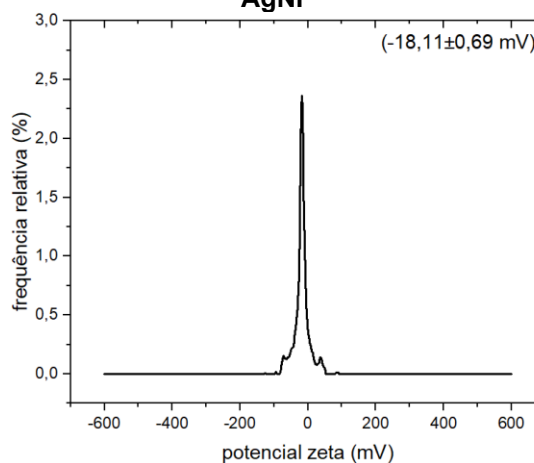
Figura 39 - Extinção de coloides de VNP

Fonte: o autor (2023)

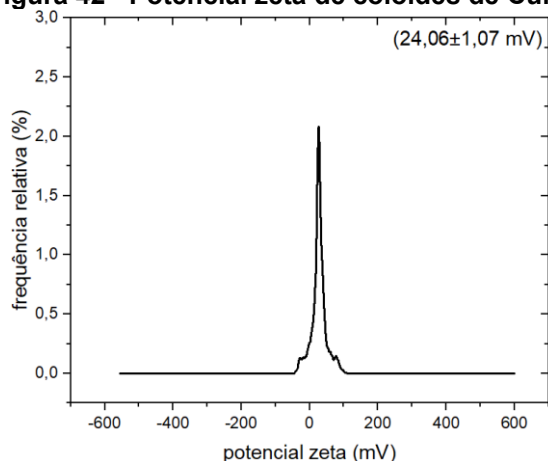
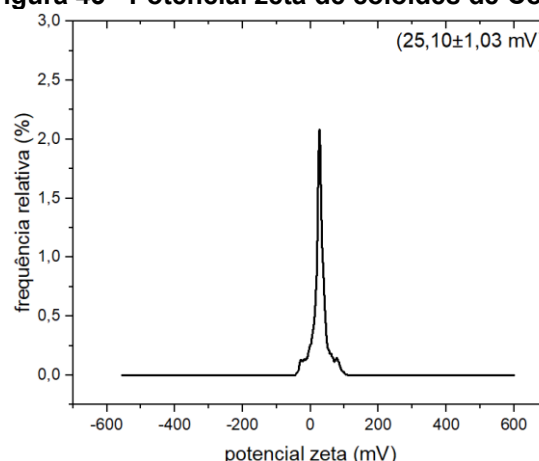
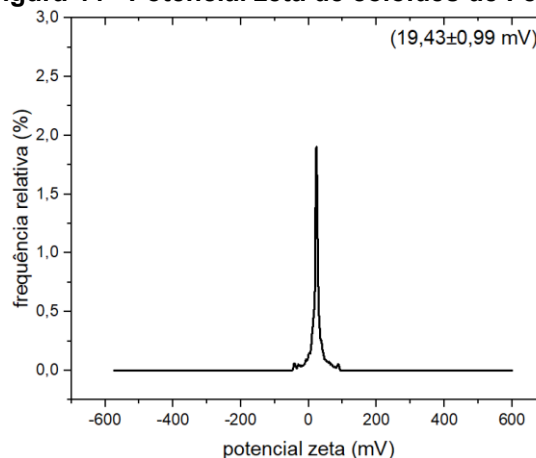
As Figuras 40, 41, 42, 43 e 44 mostram que as nanopartículas se encontram numa faixa de potencial zeta em torno de $|20| \text{ mV}$, característica de amostras com instabilidade incipiente, próximo a uma estabilidade moderada conforme a Tabela 2, o que faz com que os coloides não necessitem de agentes estabilizadores.

Figura 40 - Potencial zeta de coloides de AuNP

Fonte: o autor (2023)

Figura 41 - Potencial zeta de coloides de AgNP

Fonte: o autor (2023)

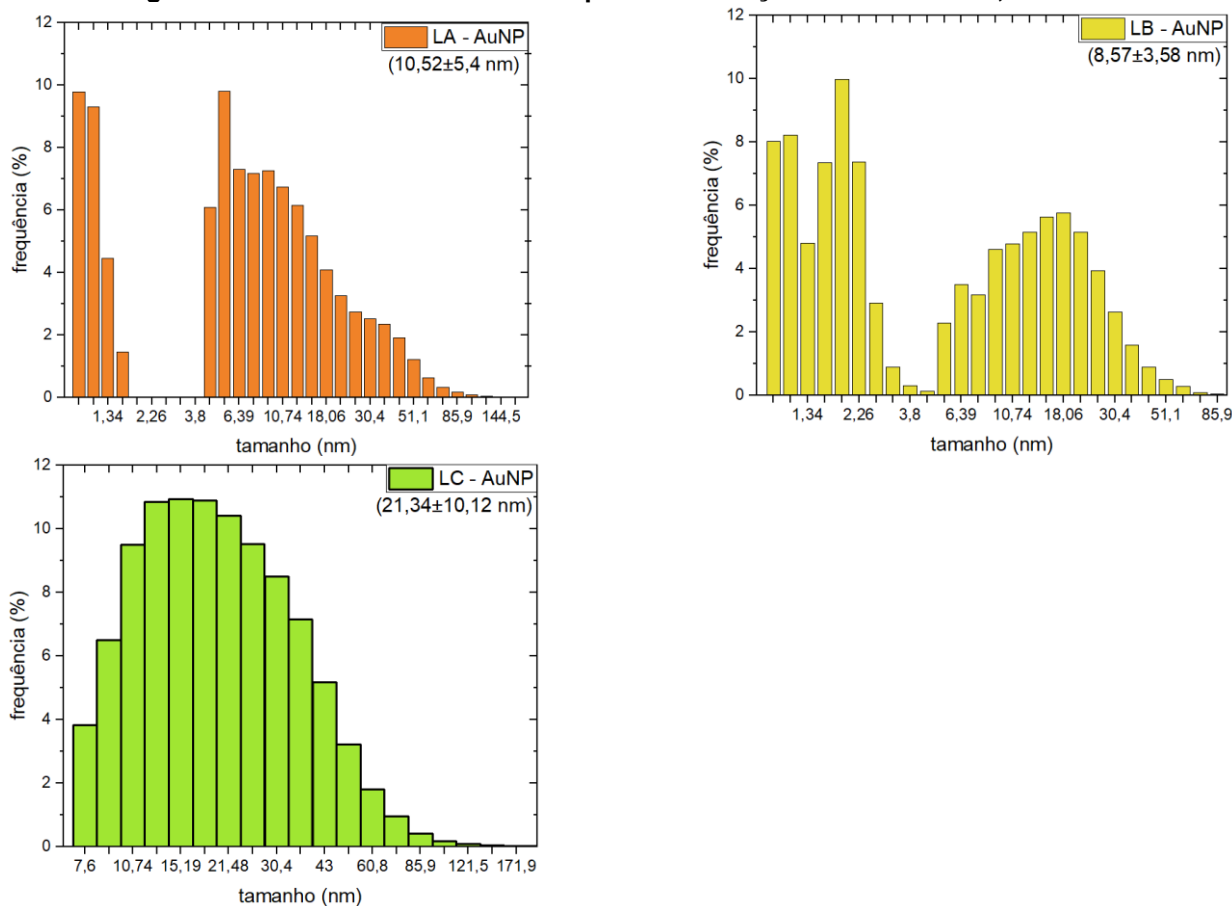
Figura 42 - Potencial zeta de coloides de CuNP**Fonte: o autor (2023)****Figura 43 - Potencial zeta de coloides de CoNP****Fonte: o autor (2023)****Figura 44 - Potencial zeta de coloides de FeNP****Fonte: o autor (2023)**

4.1.2 TEM, AFM e DLS

Nesta seção são apresentadas as medidas de dispersão de tamanho para os coloides candidatos a medições SERS, utilizando as técnicas TEM, AFM e DLS. Cabe adiantar que o processo gera nanopartículas com amplas distribuições de tamanho, mas apesar disso são apresentados os valores médios e desvio padrão de tamanho, fornecidos diretamente pelo DLS, apenas para modo de comparação entre os lotes sintetizados.

A partir da Figura 45 é possível mensurar os diâmetros das NPs de ouro produzidas

Figura 45 - DLS do coloide de AuNP para as condições de síntese LA, LB e LC

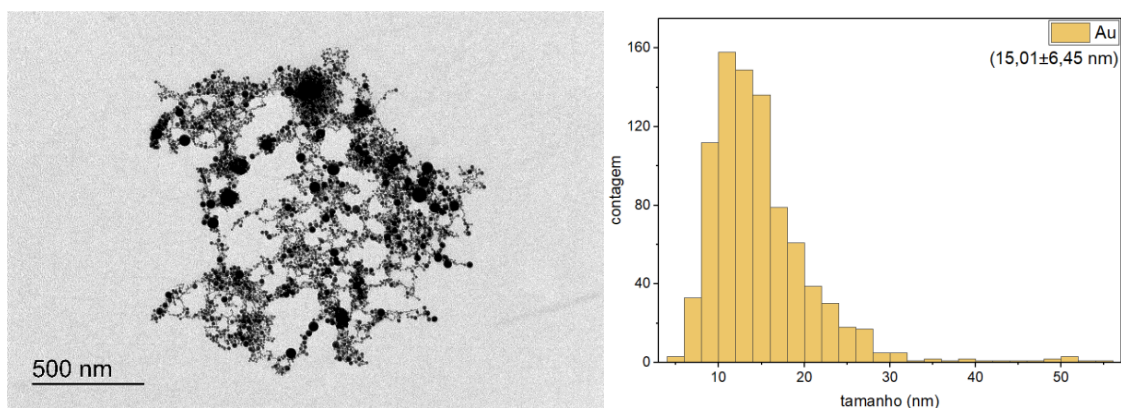


Fonte: o autor (2023)

Como indicado nos gráficos, há uma distribuição não homogênea de tamanhos das NPs. Nota-se que ao comparar os gráficos dos lotes LB e LC, seguiu-se o esperado, onde nanopartículas produzidas por um laser de comprimento de onda no IR são maiores, se comparado às produzidas por uma ablação com laser em 532 nm. Apesar de não estar na literatura, esperava-se que ao combinar a ablação com o laser emitindo nos dois comprimentos de onda, seriam produzidas tanto NPs menores, quanto NPs maiores, criando uma população de tamanho médio intermediário, o que de fato ocorreu no lote LA.

A Figura 46 apresenta uma micrografia do coloide produzido (A), bem como um gráfico de tamanho médio (B) para o lote LA. O resultado apresenta-se concordante com o obtido na Figura 45 (A), mostrando valores próximos em ambos os equipamentos.

Figura 46 - TEM do coloide de AuNP. A) imagem. B) histograma de tamanho



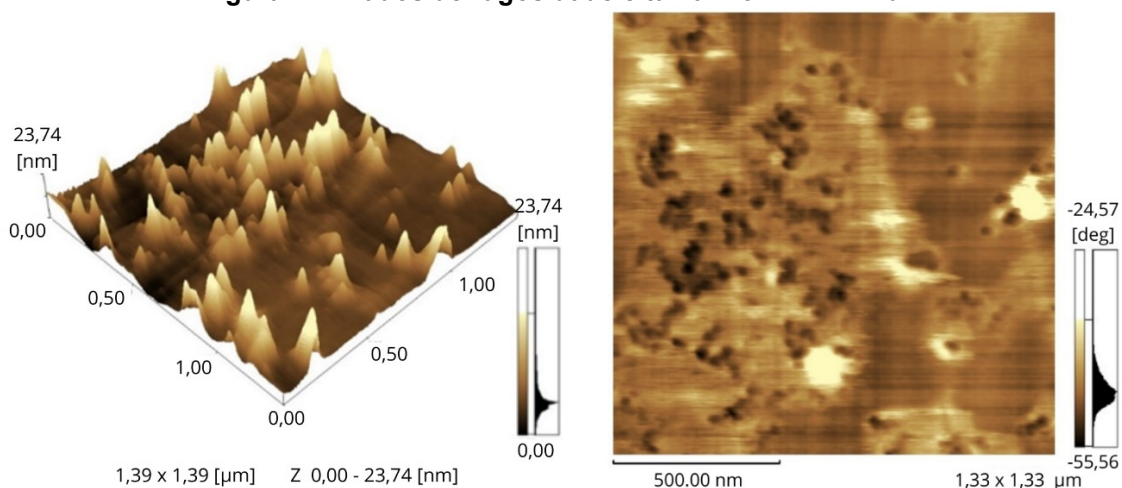
A) Imagem de aquisição.

B) histograma de tamanho das NPs de Au.

Fonte: o autor (2023)

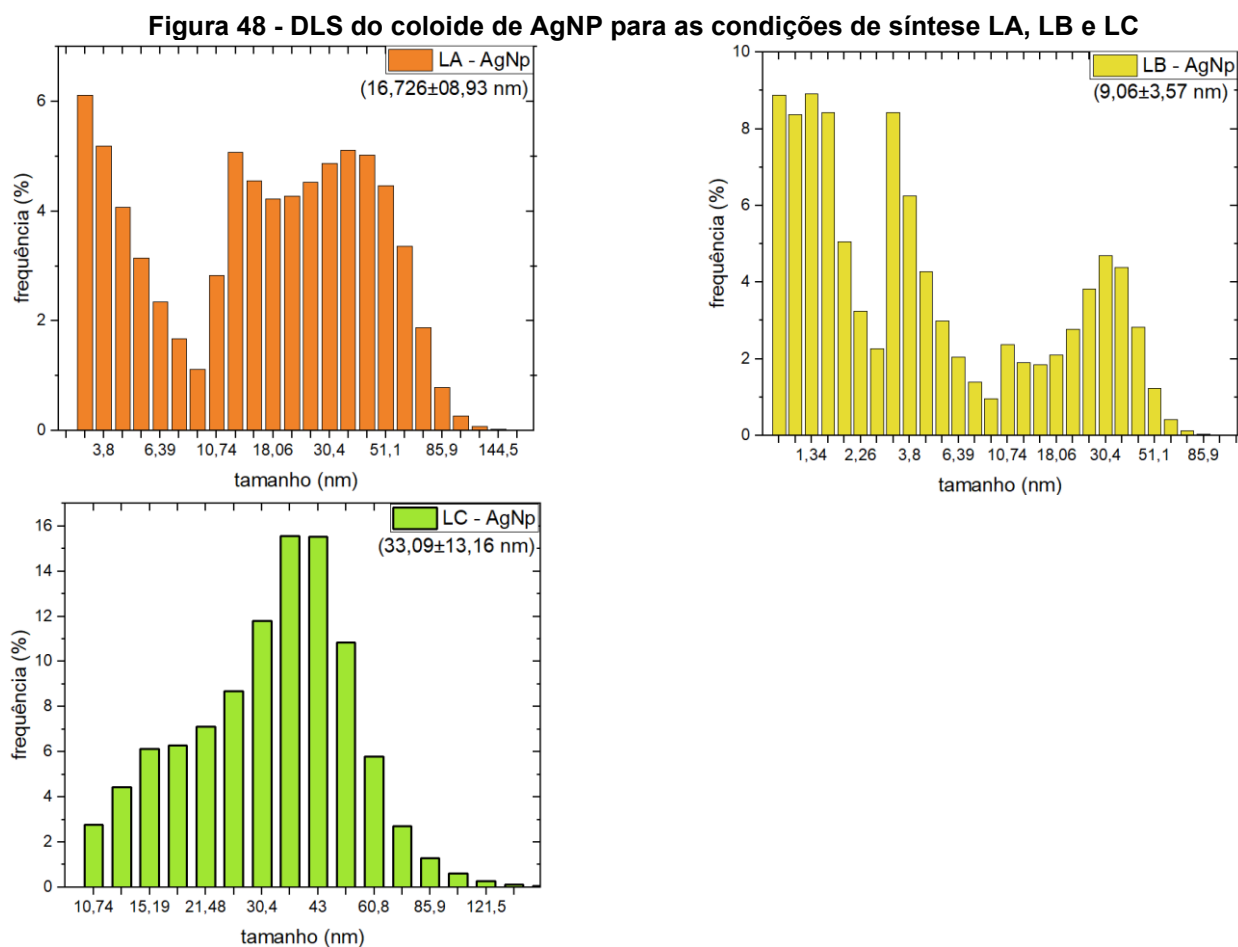
Uma terceira técnica de mensuração foi utilizada: o microscópio de força atômica. As imagens de fase obtidas são ilustradas na Figura 47. Apesar de ser uma técnica já reconhecida no meio científico para caracterização de materiais, o equipamento disponível tinha uma limitação devido ao diâmetro da ponta do cantiléver, pois a ponta tem tamanho próximo a dimensão das nanopartículas, o que fez com que o equipamento não detectasse NPs menores que 10 nm. Então a medida de tamanho e rugosidade não seria confiável.

Figura 47 - Dados de rugosidade e tamanho – AFM - AuNP



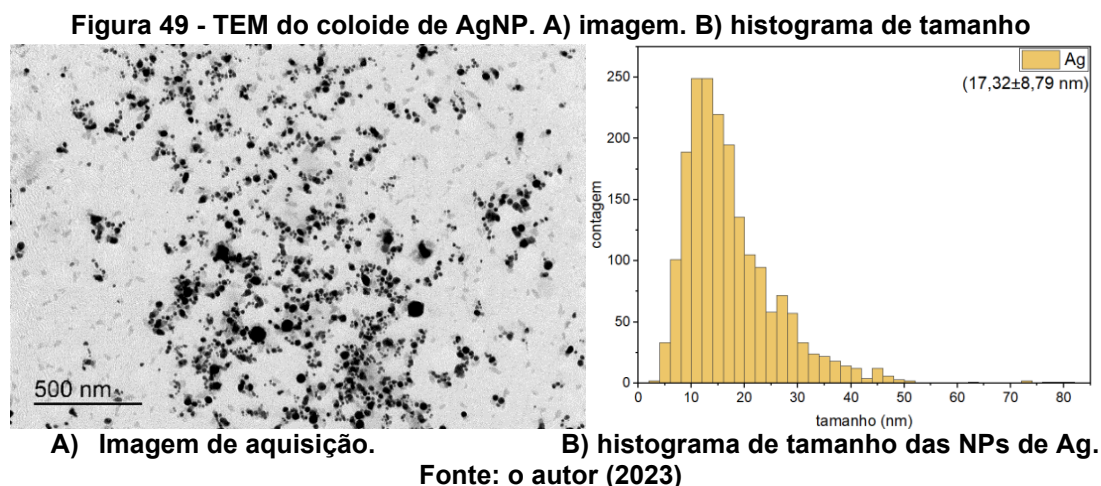
Fonte: o autor (2023)

A Figura 48 ilustra através de gráficos a distribuição de tamanhos das NPs de prata. Experimentalmente, os resultados são em conformidade com as de ouro, pois as NPs produzidas pelo laser no IR (lote LC) ficaram com tamanhos maiores, as produzidas pelo laser em 532 nm (LB) com tamanhos menores, e LA com tamanho intermediário.

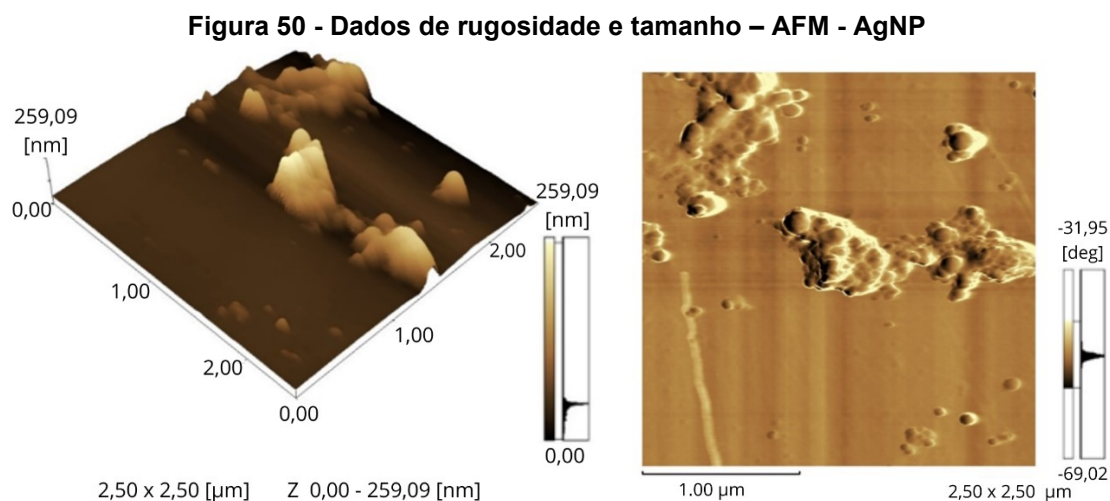


Fonte: o autor (2023)

Os resultados apresentados na Figura 49 mostram concordância com o tamanho obtido através da técnica TEM se comparado ao DLS para o lote LA.



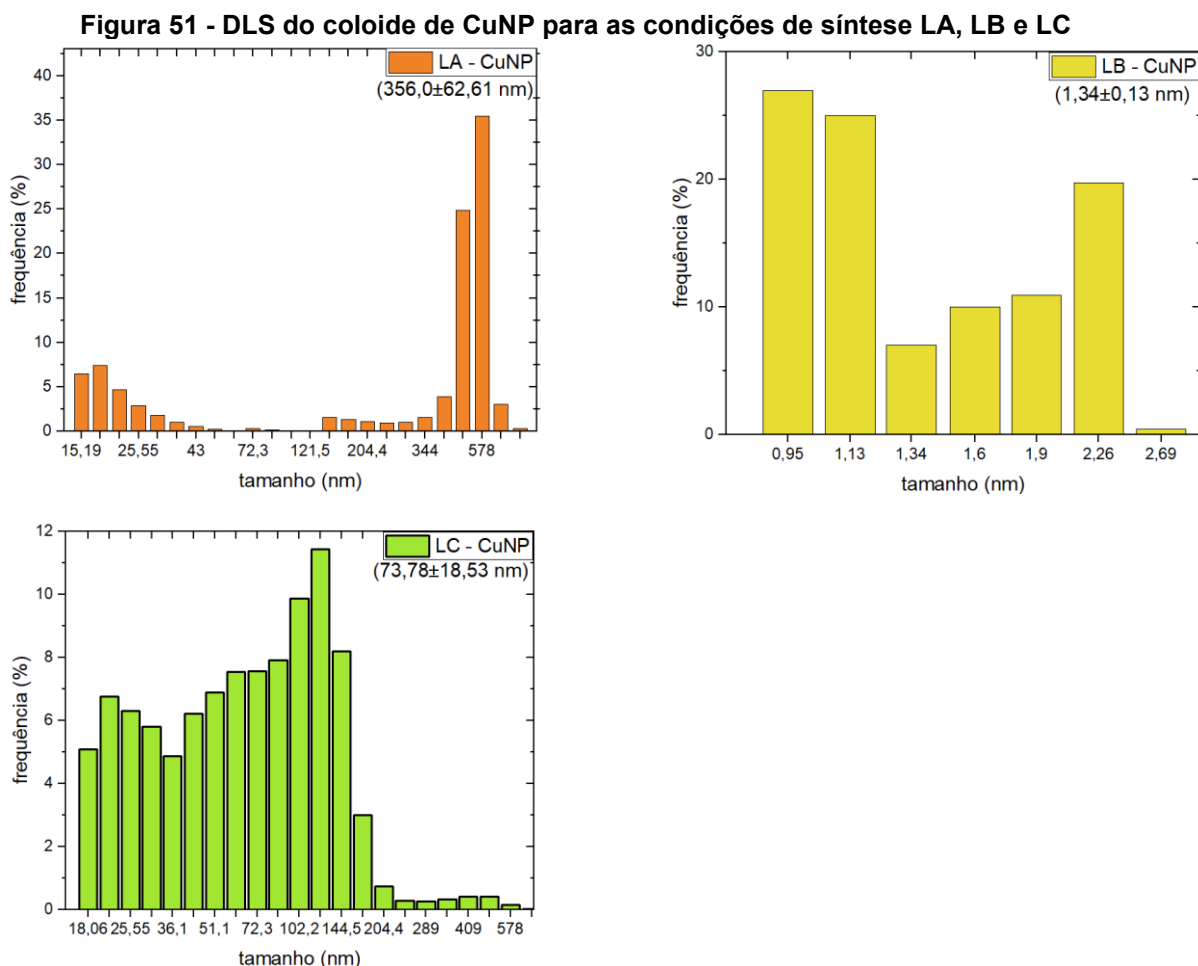
Novamente a técnica de medida AFM (ilustrada na Figura 50) não se apresentou efetiva para este trabalho pois o tamanho da ponteira é próxima ao tamanho das nanopartículas, o que faz com que nanopartículas menores não sejam detectadas, e as medidas não sejam confiáveis.



Fonte: o autor (2023)

Um resultado diferente do esperado aconteceu para as nanopartículas de cobre produzidas, conforme visto na Figura 51. Até então, ao usar o laser com apenas um harmônico, novamente mostrou a relação de comprimento de onda vs. Tamanho (itens B e C). Mas ao olhar para os resultados de dispersão de

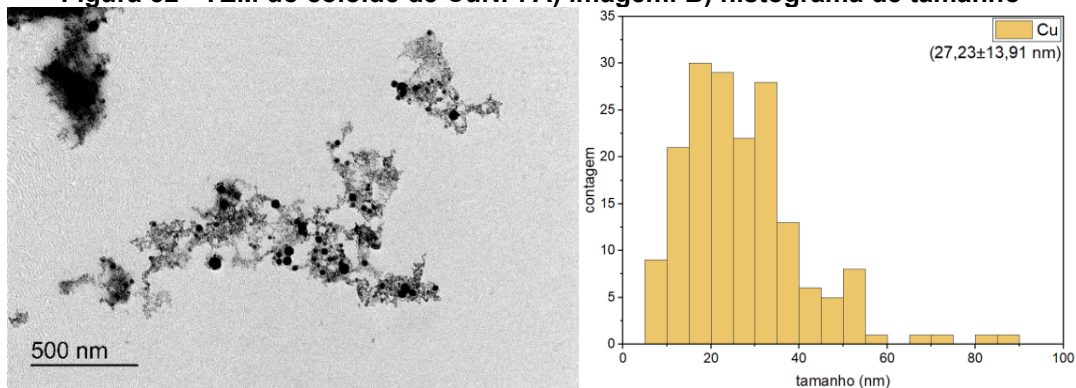
tamanho das nanopartículas produzidas pelos dois comprimentos de onda simultaneamente (LA), fica evidente uma grande população de nanopartículas entre 300 e 600 nm. Isto pode significar que as nanopartículas foram agregadas durante a ablação, formando grandes aglomerados (*melting*).



Fonte: o autor (2023)

O resultado do DLS pode ser confrontado pelo resultado do TEM (ilustrado na Figura 52), onde uma pequena parte da amostra do lote LA é analisada, mas ao fazer a medida do diâmetro da amostra, percebe-se que o valor médio está entre os valores obtidos para os lotes LB e LC, como mostrado na Figura 51.

Figura 52 - TEM do coloide de CuNP. A) imagem. B) histograma de tamanho



A) Imagem de aquisição.

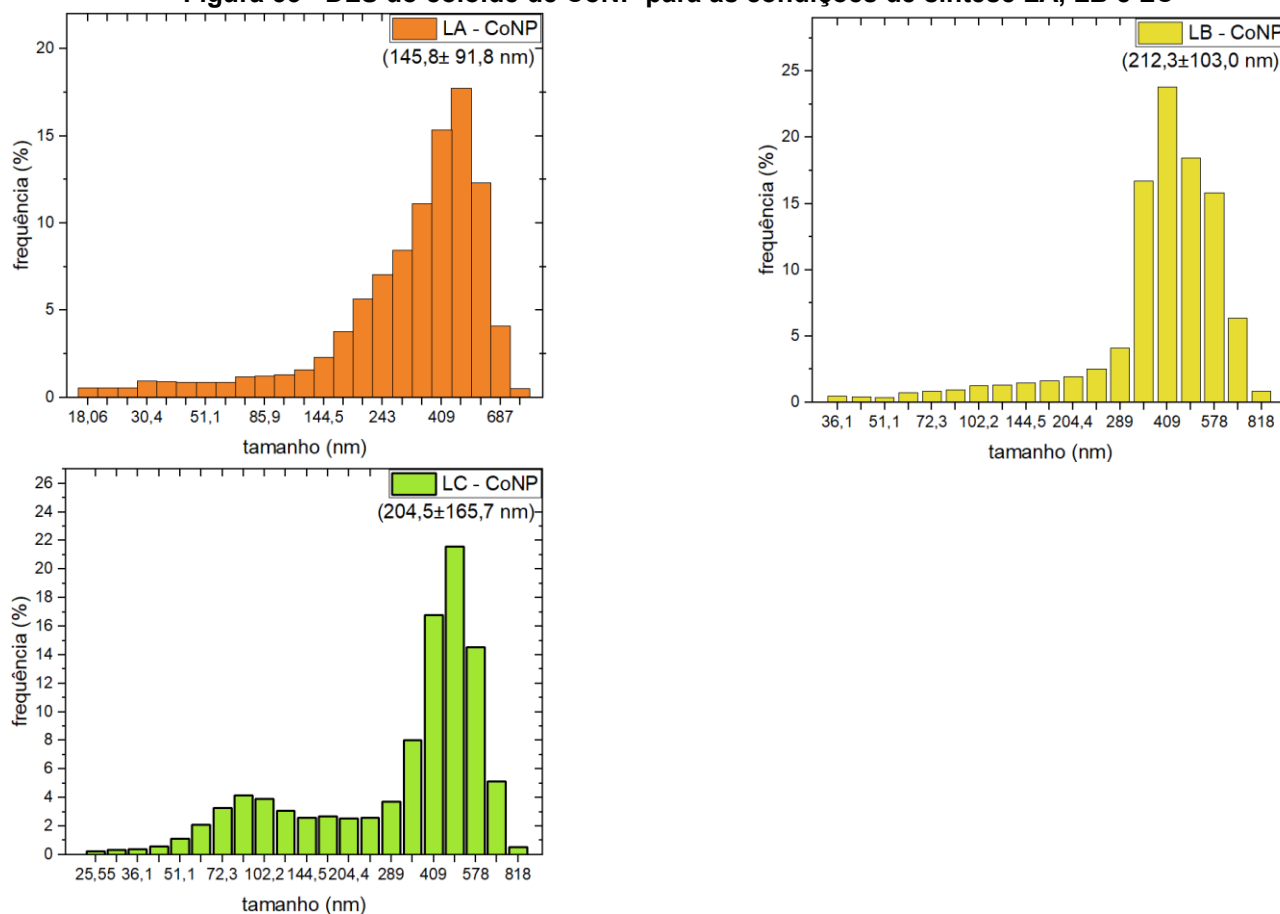
B) histograma de tamanho NPs de Cu.

Fonte: o autor (2023)

A

Figura 53 representa os gráficos de dispersão de tamanho obtidos via DLS para os coloides de cobalto. Estes dados mostram que as nanopartículas produzidas demonstraram maior desvio do que era esperado em relação a tamanho médio. O comportamento da produção deveria ser que o lote LC apresentaria maior média, se comparado ao LB, o que não ocorreu. Mas deve-se levar em consideração o tamanho da incerteza das medidas, o que pode influenciar nesta conclusão.

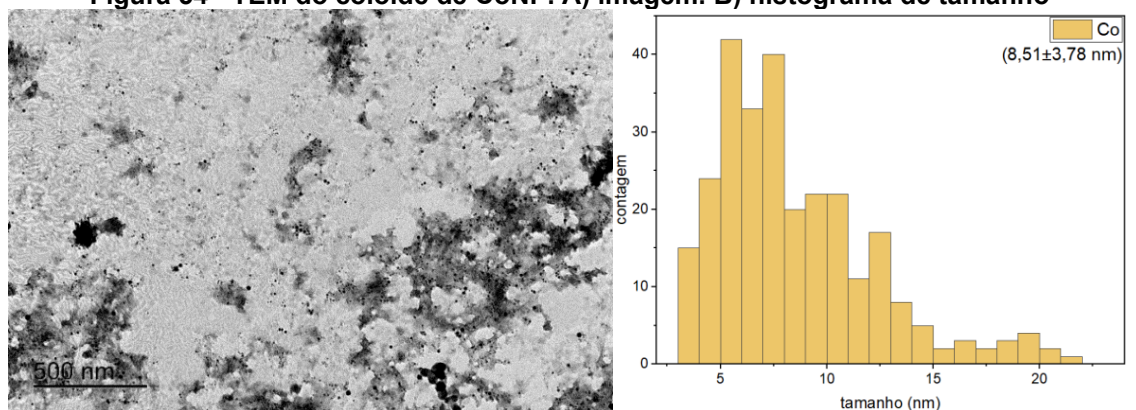
Figura 53 - DLS do coloide de CoNP para as condições de síntese LA, LB e LC



Fonte: o autor (2023)

E, ao apresentar a medida feita em TEM (Figura 54), o resultado apresenta uma discrepância de 94,2% se comparado ao DLS. Deve se levar em consideração que para fazer a medição através do TEM, uma fração muito pequena da amostra é analisada, o que pode influenciar no resultado.

Figura 54 - TEM do coloide de CoNP. A) imagem. B) histograma de tamanho



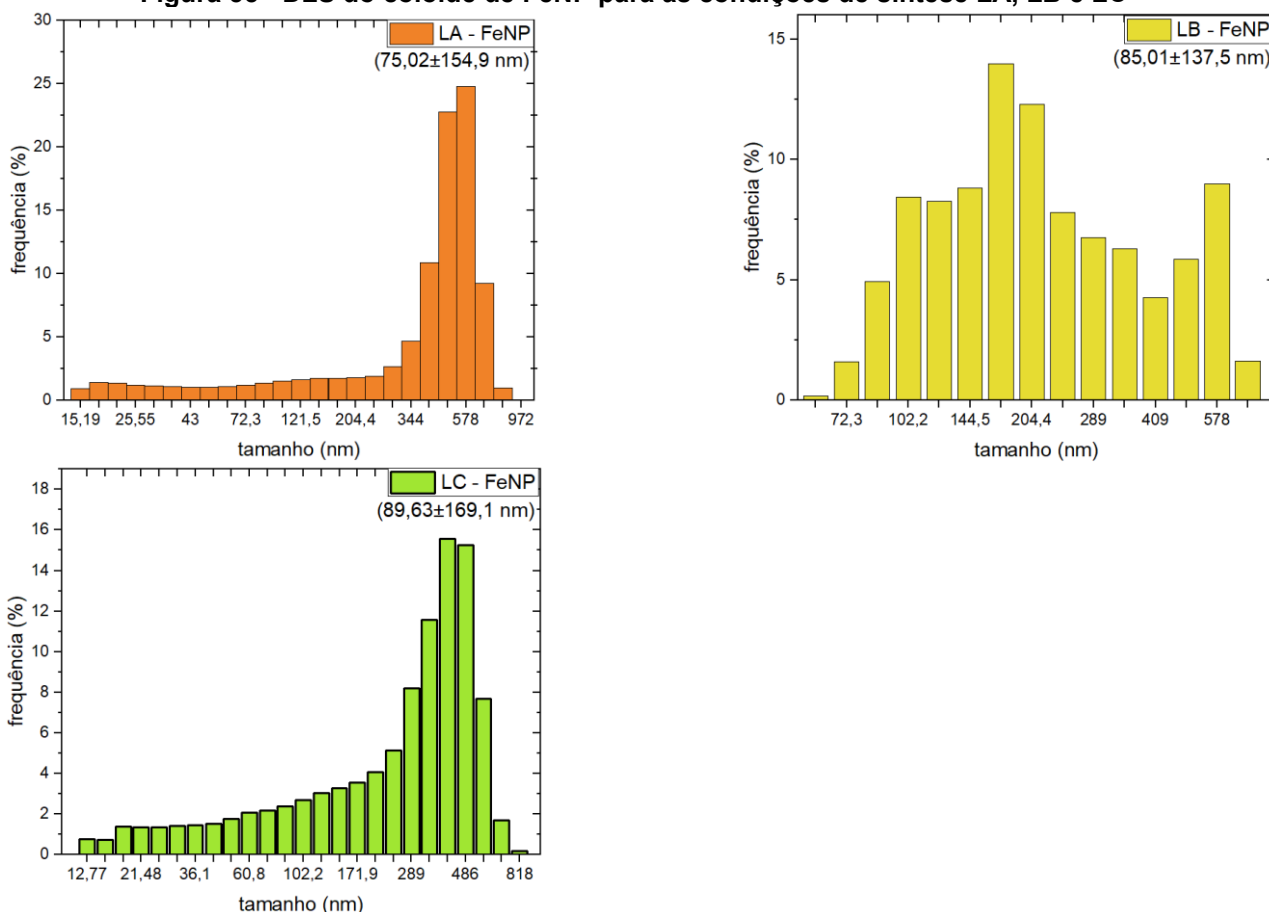
A) Imagem de aquisição.

B) histograma de tamanho das NPs de Co.

Fonte: o autor (2023)

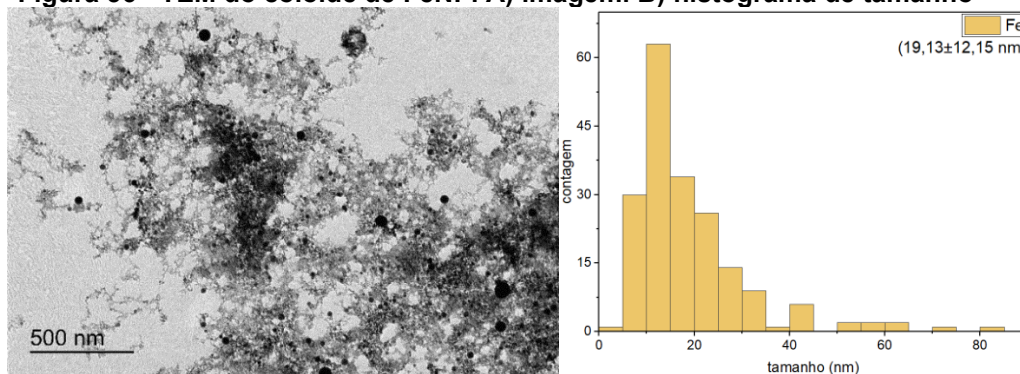
São apresentados na Figura 55 os resultados dos tamanhos médios das nanopartículas de ferro através da técnica DLS. Como em todos os outros colóides, aqui fica evidente a não homogeneidade de tamanho nas amostras produzidas. O comportamento esperado aparece quando se compara as medidas de tamanho do lote LB (menor, produzido pelo laser verde) com o lote LC (maior, produzido pelo laser no IR). Mas o lote LA apresenta uma singularidade, pois há uma grande população de nanopartículas de tamanho menores que 100 nm, o que faz com que a média decaia, e apresente um valor menor que o lote LB.

Figura 55 - DLS do coloide de FeNP para as condições de síntese LA, LB e LC



Fonte: o autor (2023)

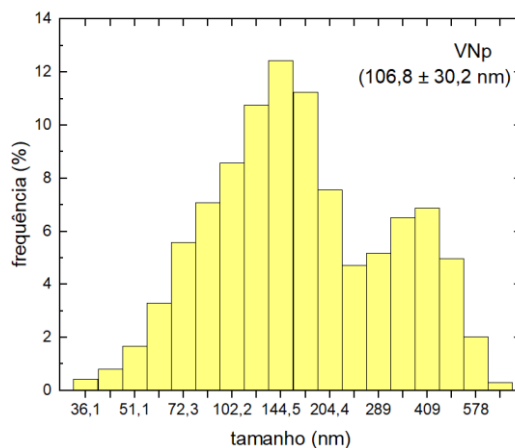
Figura 56 - TEM do coloide de FeNP. A) imagem. B) histograma de tamanho



A) Imagem de aquisição. B) Histograma de tamanho das NPs de Fe.
Fonte: o autor (2023)

Para a caracterização da dispersão de tamanho das NPs de vanádio, foram feitas medidas somente de DLS, ilustrada na Figura 57:

Figura 57 - DLS do coloide de VNP para as condições de síntese LA



Fonte: o autor (2023)

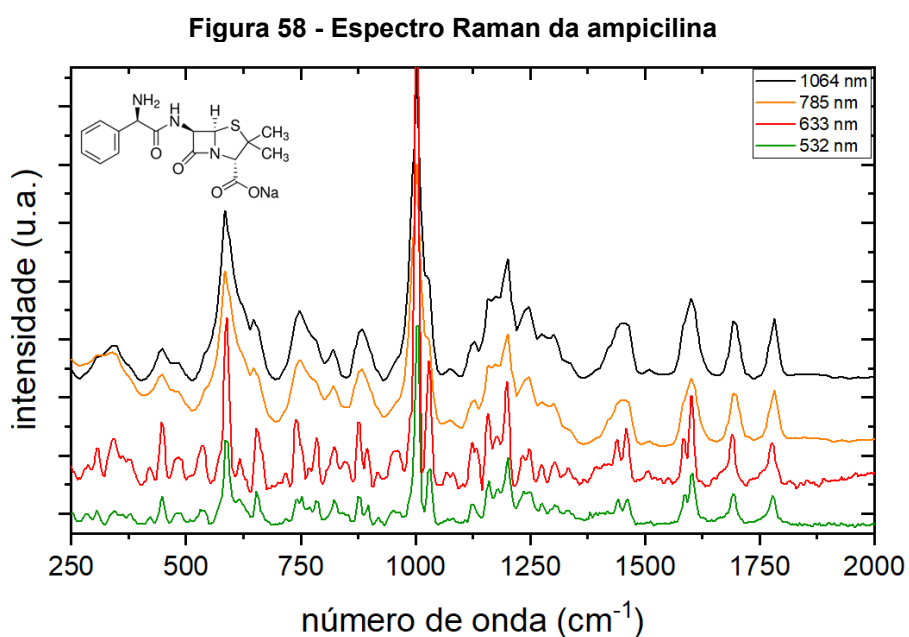
No geral, fica evidente que nenhum dos coloides produzidos apresentaram nanopartículas com tamanhos homogêneos. O tipo de alvo pode influenciar no tamanho das NPs produzidas. Fica claro também que o comprimento de onda do laser tem influência no tamanho das nanopartículas.

4.2 Espectroscopia Raman

Nessa seção apresentam-se os resultados obtidos para o espectro Raman em quatro comprimentos de onda diferentes (532, 633, 785 e 1064 nm) de cada antibiótico na forma sólida (pó). A variação do comprimento de onda da luz incidente permite a obtenção de informações sobre as vibrações moleculares,

proporcionando uma análise detalhada das amostras, visando avaliar a influência do comprimento de onda na resolução dos espectros Raman.

Na Figura 58 são apresentadas as medidas de espectroscopia Raman no intervalo entre 250 e 2000 cm^{-1} , feito com quatro comprimentos de onda diferentes. As principais bandas vibracionais estão listadas na Tabela 5, com suas respectivas atribuições baseadas em comparações com dados previamente publicados.



Fonte: o autor (2023)

Tabela 5 - Assinalamento de bandas da ampicilina

Número de onda (cm^{-1}) medido	Número de onda (cm^{-1}) teórico	Atribuição
586	583	Anel Tiazolidina
748	750	Anel β -lactâmico
1002	1005	Anel benzênico (CC)
1600	1600	Anel benzênico (CC)
1692	1692	Anel β -lactâmico (C=O)
1782	1782	Anel β -lactâmico (C=O)

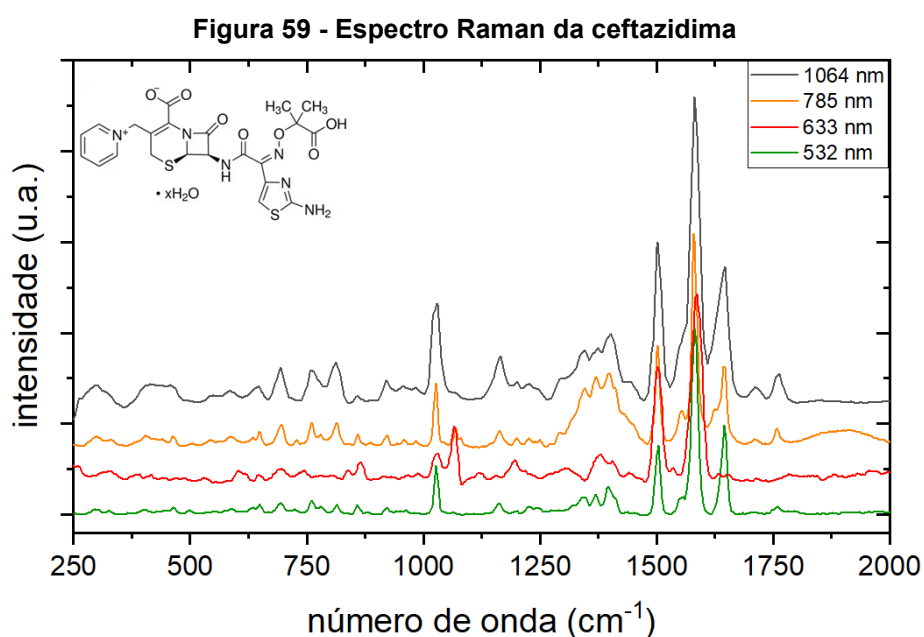
Fonte: o autor (2023), conferido em (BAIA, ASTILEAN e ILIESCU, 2008), (SCHRADER, 1995), (ANDREOU, MIRSAFAVI, *et al.*, 2015) (MARANGONI, 2022)

Esta região selecionada apresenta grande quantidade de bandas e é rica em informação estrutural. É evidente uma vibração muito intensa na região de 1002 cm^{-1} , que está associada ao anel benzênico da molécula. Os dois últimos

picos de vibração são associados às vibrações do anel β -lactâmico. Nota-se que as medidas realizadas são bem próximas às feitas (ou previstas) nos referenciais teóricos.

Ficou claro também na Figura 58 a resolução espacial depende do comprimento de onda do laser. Os picos relacionados às vibrações para o laser operando em 532 nm se apresentaram mais definidos e distinguíveis, do que para o laser operando no IR. Exemplo disso é verificado na região de 1602 cm^{-1} , que fica melhor resolvido apresentando um pico vibracional em 1584 cm^{-1} , bem como uma banda larga em 1456 cm^{-1} que resolve em dois picos medidos em 1539 cm^{-1} e em 1459 cm^{-1} .

Da mesma maneira, na Figura 59 são apresentadas as medidas de espectroscopia Raman no intervalo de frequência entre 250 e 2000 cm^{-1} , feito com quatro comprimentos de onda diferentes, agora para o antibiótico ceftazidima.



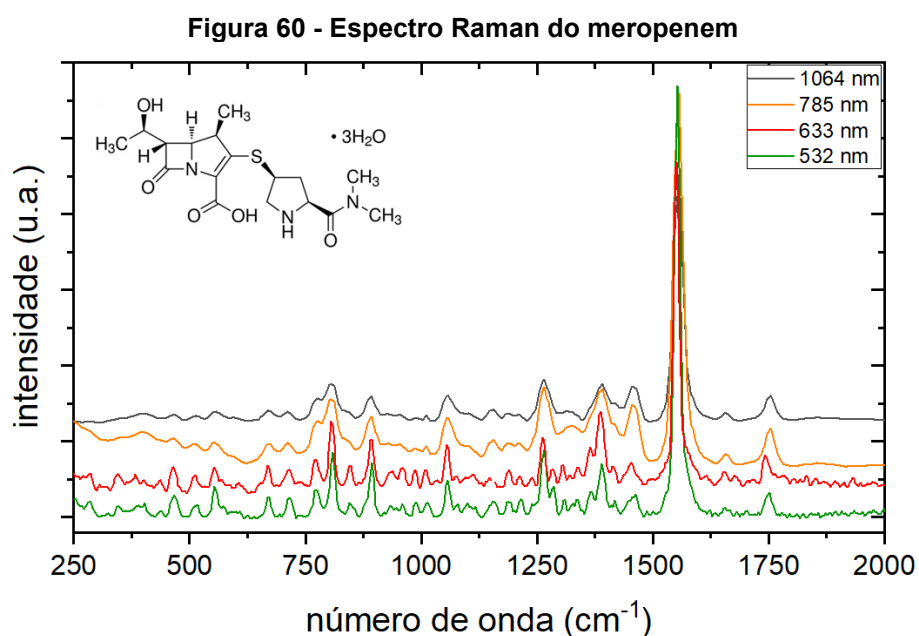
Fonte: o autor (2023)

Diferentemente da ampicilina, tal antibiótico foi pouco explorado na literatura, e não se encontrou artigos em periódicos, ou seções de livros que façam assinalamento de bandas para a ceftazidima.

Porém, os três picos mais intensos foram detectados por (HOSSEINI, JONGSMA, *et al.*, 2003), o qual apresenta um gráfico muito semelhante ao aqui medido. Os autores encontraram picos na região de 1028 cm^{-1} (medido em 1026), 1506 cm^{-1} (medido em 1502), 1586 cm^{-1} (o mais intenso – medido em 1582) e 1641 cm^{-1} (medido em 1646). Neste artigo, os autores não associam as vibrações a nenhuma parte da molécula, pois não era o objetivo do trabalho.

De acordo com (QI, CHEN, *et al.*, 2018) o pico Raman mais intenso próximo a 1586 cm^{-1} é devido à ligação C=O do tipo alongamento, no qual a medição feita foi em 1582 cm^{-1} , variando pouco em relação a medida apresentada. Uma vibração associada também é apresentada por (SCHRADER, 1995) na região de 1710 cm^{-1} .

Na Figura 60 são apresentadas as medidas de espectroscopia Raman no intervalo de frequência entre 250 e 2000 cm^{-1} , feito com quatro comprimentos de onda diferentes para o meropenem. As principais bandas vibracionais estão listadas na Tabela 6, com suas respectivas atribuições feitas a partir de comparações com dados já publicados na literatura.



Fonte: o autor (2023)

Tabela 6 - Assinalamento de bandas do meropenem

Número de onda (cm^{-1}) medido	Número de onda (cm^{-1}) teórico	Atribuição
712	715	Anel de pirrolidina
776	771	C-O-H
1184	1188	C-O-H
1266	1265	Dimetilcarbamoil (C-N)
1392	1391	Anel β -lactâmico(C-N)
1418	1417	Anel β -lactâmico (C-N)
1556	1553	Anel de pirrolidina / Anel β -lactâmico (C-C)
1754	1751	Anel β -lactâmico (C=O)

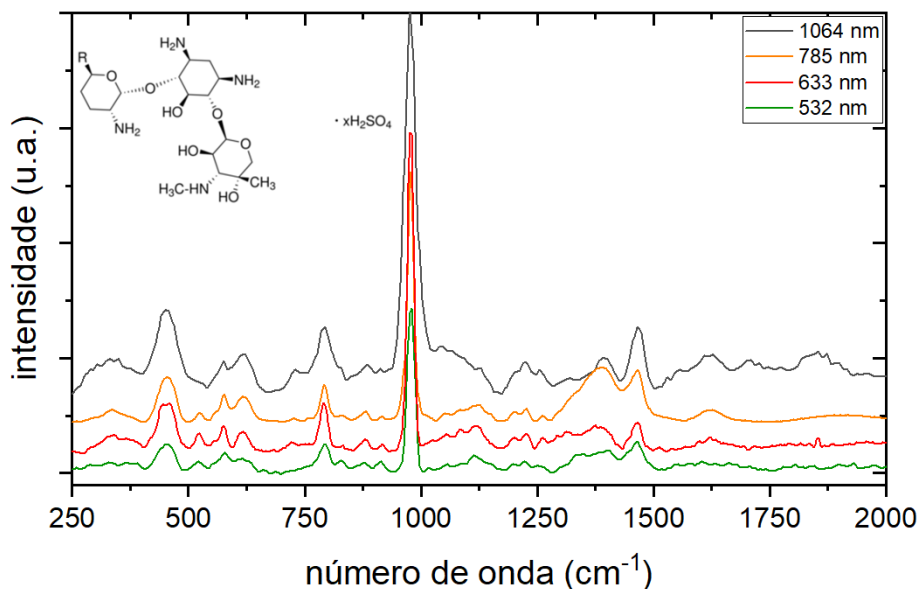
Fonte: o autor (2023), conferido em (CIELECKA-PIONTEK, PACZKOWSKA, *et al.*, 2013)

Uma grande gama de informações espectrais é evidente na faixa correspondente também entre 250 e 2000 cm^{-1} . Os modos vibracionais correspondentes às vibrações da ligação C-O-H no grupo da carboxila são localizados na região entre 653 e 690 cm^{-1} . A vibração mais intensa em 1556 cm^{-1} é associada ao anel β -lactâmico e ao anel de pirrolidina.

Outras vibrações associadas ao anel β -lactâmico são associadas às vibrações em 1392, 1418, 1754 cm^{-1} . Neste experimento também é possível identificar o poder de resolução quando observamos os modos vibracionais nas bandas próximas à 1266 cm^{-1} , que ficam mais bem resolvidas em 532 nm apresentando um segundo pico em 1284 cm^{-1} . Fenômeno também perceptível em 1388 cm^{-1} , que no visível apresenta um segundo pico em 1368 cm^{-1} .

Seguindo a mesma metodologia, foram obtidos espectros Raman (ilustrados na Figura 61) para a gentamicina utilizando quatro comprimentos de onda de excitação. A região de análise foi escolhida entre 250 e 2000 cm^{-1} , a qual apresenta a maior parte das informações sobre as vibrações moleculares.

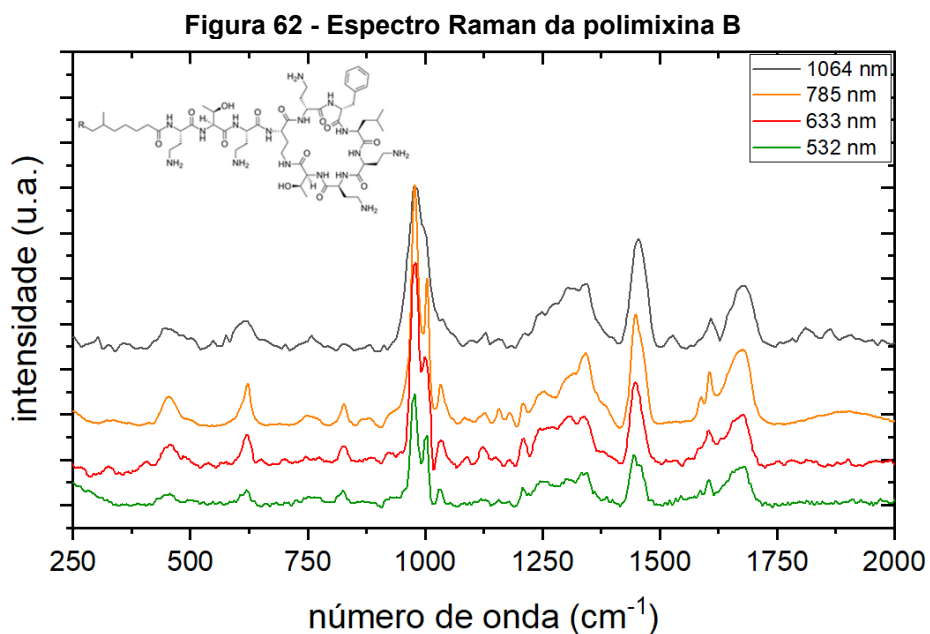
Figura 61 - Espectro Raman da gentamicina



Fonte: o autor (2023)

Pouco se tem informação na literatura sobre o espectro da gentamicina, porém, segundo (ZALESKI, CLARK, *et al.*, 2017) o pico mais intenso do espectro é associado ao modo alongamento de vibração do grupo C-O-C, medido pelos autores em 980 cm^{-1} (neste trabalho em 978 cm^{-1}) e em 790 cm^{-1} (neste trabalho em 792 cm^{-1}) ao C-H tipo balanço. Talvez pela singularidade da amostra da gentamicina, nos espectros obtidos não há tanta observação quanto ao poder de resolução, há algo sutil na banda de 524 cm^{-1} que não é resolvida quando se utilizou o laser em 1064 nm .

Para a polimixina B também foram obtidos espectros com laser operando em quatro comprimentos de onda diferentes. Os espectros obtidos são ilustrados na Figura 62.

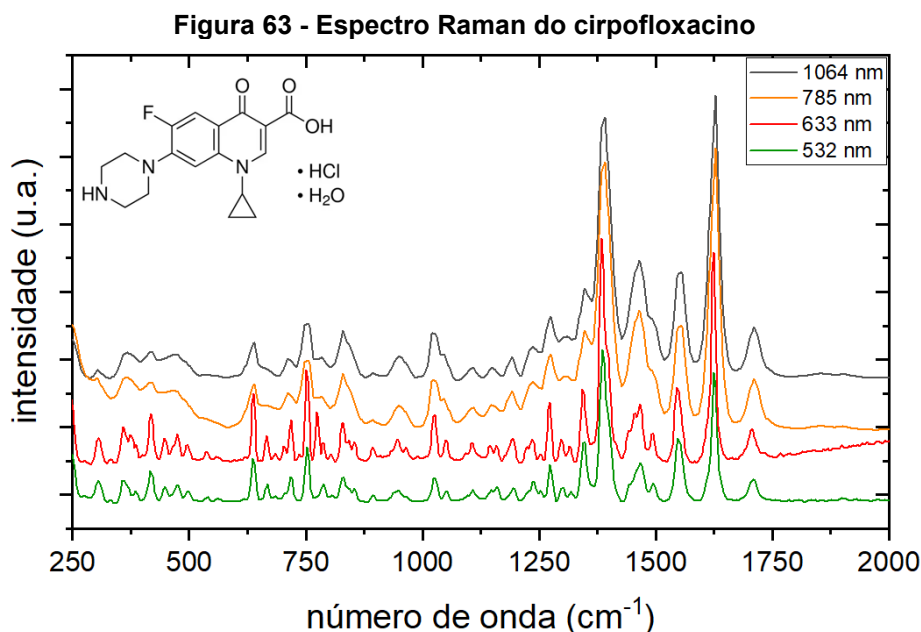


Fonte: o autor (2023)

Diferentemente dos outros antibióticos, não foram encontrados na literatura trabalhos que mostram os espectros deste fármaco, tão menos assinalamento de banda para identificação das vibrações. Apesar disto, fica evidente a quantidade de informação molecular presente no intervalo de frequência entre 250 e 2000 cm^{-1} .

É possível destacar o poder de resolução associado ao comprimento de onda nestas medições. A exemplo da larga banda apresentada em 978 cm^{-1} , quando a medida foi feita utilizando o espectrômetro com laser operante em 1064 nm , e comparado com três picos resolvidos nas posições 978, 1004 e 1032 cm^{-1} que são evidenciados nas outras medidas.

Na Figura 63 é ilustrado os espectros Raman obtidos para o ciprofloxacino, com informações obtidas na região entre 250 e 2000 cm^{-1} .



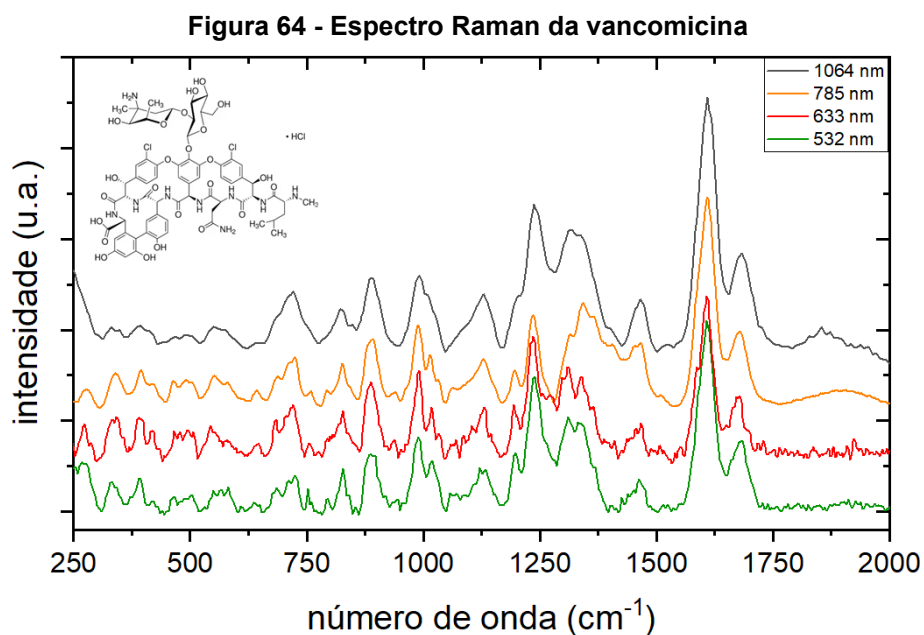
Fonte: o autor (2023)

Os espectros obtidos estão em conformidade com (HIDI, HEIDLER, *et al.*, 2016). As vibrações localizadas em 1454 cm^{-1} (medido em 1464 cm^{-1}) estão associadas com o anel piperazinil, já em 1263 e 1362 cm^{-1} (medidas em 1274 e 1348 cm^{-1}) são vibrações associadas com alongamento do anel. Uma banda mais intensa é encontrada em 1382 cm^{-1} (medido em 1392 cm^{-1}) pois, segundo os autores, o alongamento do anel aromático é acoplado com os modos de vibração do grupo COO. Este resultado também foi demonstrado por (LI, WU, *et al.*, 2016), os quais mediram o sinal em 1387 cm^{-1} . A banda em 1616 cm^{-1} (medido em 1628 cm^{-1}) é devida aos alongamentos causados por C=C, e em 1541 cm^{-1} (medido em 1554 cm^{-1}) pelas vibrações do sistema do anel da quinolona.

Nota-se o poder de resolução presente nos espectros obtidos. Há um amplo aumento na resolução na região que compreende entre 740 e 787 cm^{-1} , bem como na região entre 1192 e 1392 cm^{-1} . A banda larga apresentada em 830 cm^{-1} é mais bem resolvida para os lasers em 532 nm, mostrando picos que estavam “escondidos” também em 894 cm^{-1} . Uma banda larga com pico em

1464 cm^{-1} tem a resolução aumentada e mostra um modo vibracional em 1495 cm^{-1} .

Os espectros Raman da vancomicina são ilustrados na Figura 64, compreendendo uma faixa de frequência de 250 a 2000 cm^{-1} . Foram também utilizados quatro comprimentos de onda para o laser de excitação.



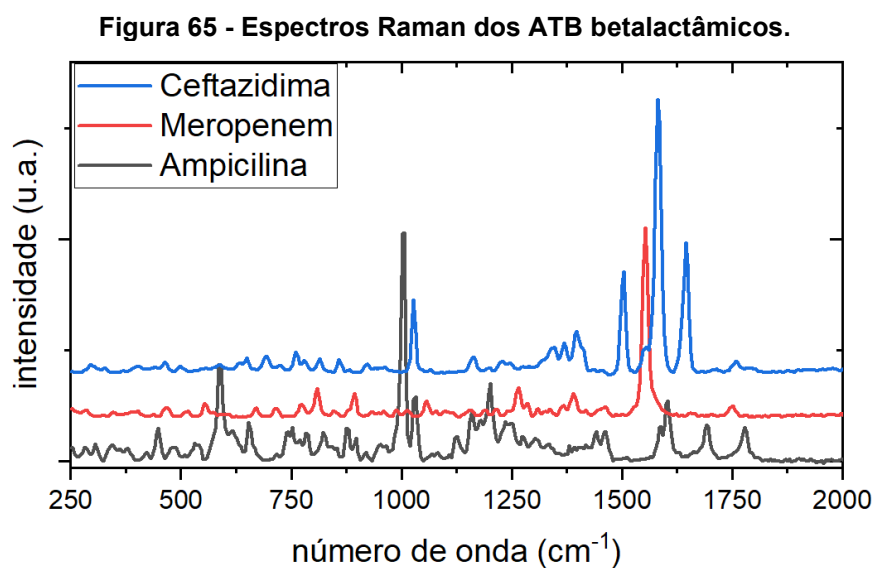
Fonte: o autor (2023)

Para tal medicamento também não foi encontrado na literatura espectros Raman associados a este ATB sozinho, apenas na presença de alguma bactéria (por exemplo *Escherichia coli*). Novamente, é possível analisar na comparação dos espectros a maior resolução para menores comprimentos de onda, sendo exemplificado pela banda larga presente em 990 cm^{-1} a qual é resolvida para dois picos em 990 e 1014 cm^{-1} . O mesmo acontece com o pico em 1236 cm^{-1} , no qual com lasers de excitação nos três menores comprimentos de onda aparece com melhor resolução, acrescido de um pico em 1236 cm^{-1} .

Para todos os ATBs selecionados foram medidos seus respectivos espectros Raman, evidenciando que esta técnica pode ser útil no monitoramento de antibióticos pois, como demonstrado, cada molécula interrogada apresenta um espectro único (*fingerprint*). Fica registrado também que comprimentos de

onda menores do laser de excitação (532 e 633 nm) distingue mais um pico de vibração, se comparado a comprimento de ondas maiores (785 e 1064 nm).

Através desta técnica, com o uso de métodos estatísticos pode ser feito classificações de antibióticos com base nas estruturas características da sua molécula. Exemplo disto é apresentado na Figura 65, que ilustra os espectros dos três antibióticos β -lactâmicos:



Fonte: o autor (2023)

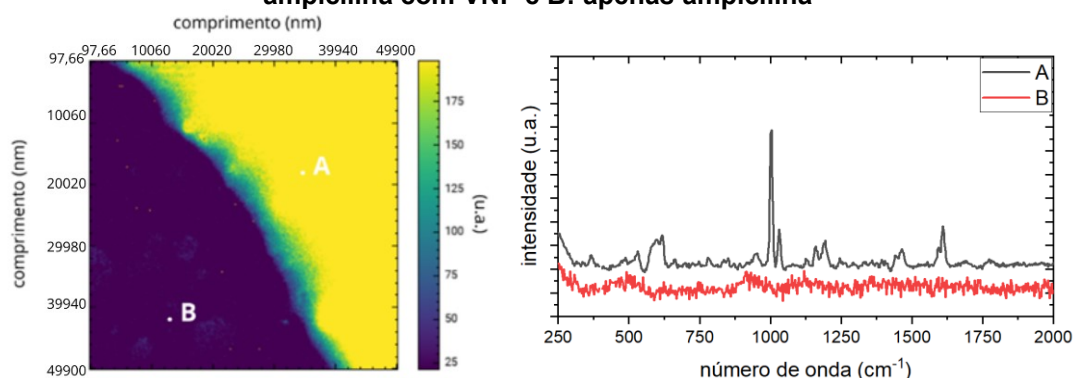
Para os três casos de espectros, são comparáveis as regiões que compreendem entre 1500 e 1800 cm^{-1} . As vibrações associadas nesta região são causadas pelo anel β -lactâmico, em especial à ligação C=O. Como esta ligação está localizada na molécula de maneira diferente para cada ATB, pode sofrer deslocamento do grupo de bandas. Para comparações dos outros antibióticos, são necessárias mais amostras de ATBs diferentes pertencentes a mesma classe. Com uma quantidade maior de espectros distintos, pode ser feito análises estatísticas multivariadas como a análise de componentes principais (PCA) e a regressão linear multivariada (MLR), a fim de investigar padrões de vibrações para uma mesma classe de ATBs.

4.3 Espectroscopia SERS

Nesta seção apresentam-se os resultados obtidos para o espectro SERS de cada antibiótico diluído em água testado para espectrômetro operando em dois comprimentos de onda diferente (532 e 633 nm). As amostras diluídas foram testadas de diferentes maneiras, variando a potência do laser, tempo de integração e tipo de nanopartícula.

Com o antibiótico ampicilina, vários testes foram feitos pois na literatura este é recorrente, devido à sua relevância e processo histórico de síntese do mesmo (BAIA, ASTILEAN, ILIESCU, 2008, SCHRADER, 1995, ANDREOU, MIRSAFAVI, *et al.*, 2015, MARANGONI, 2022). Uma das metodologias utilizadas resultou no espectro obtido na Figura 66. Uma gota com nanopartículas de vanádio (de 5 μl) foi depositada na lâmina de vidro e esperada secar. Devido à sua cor amarela intensa, o processo de depositar uma gota com o ATB diluído em 0,5 ml de água pura foi facilitado (esta amostra é transparente), conforme descrito na metodologia, na Figura 30. Após a secagem, que demorou por volta de 10 minutos, a lâmina de vidro foi colocada no espectrômetro e ajustada para que o laser fizesse um mapa numa região de 50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ (256 pontos). O tempo para obtenção dos dados foi de aproximadamente 7 horas.

Figura 66 - Medida SERS (laser em 5,2 mW, tempo de integração de 500 ms) da ampicilina na concentração de 5,4 mM. Mapa e os espectros para os pontos A: ampicilina com VNP e B: apenas ampicilina



Fonte: o autor (2023)

Com o mapa finalizado, a banda mais intensa da ampicilina (1002 cm^{-1} atribuído ao anel benzênico) foi selecionada como referência. Na região A do

mapa, onde havia o coloide de vanádio adicionado ao antibiótico foi possível encontrar o espectro característico do ATB, ao contrário da região B onde só havia o fármaco diluído. Para apresentarmos o espectro da Figura 66, 15 espectros de pontos distintos foram selecionados nesta região, e feita uma média aritmética entre eles. A presença de nanopartículas de vanádio promoveu uma intensificação do sinal do antibiótico. Deve ser levado em consideração que o processo de secagem da amostra faz com que as nanopartículas fiquem em maior quantidade na borda da gota (efeito anel), por isso a escolha de que esta seria uma boa região para a medição do espectro.

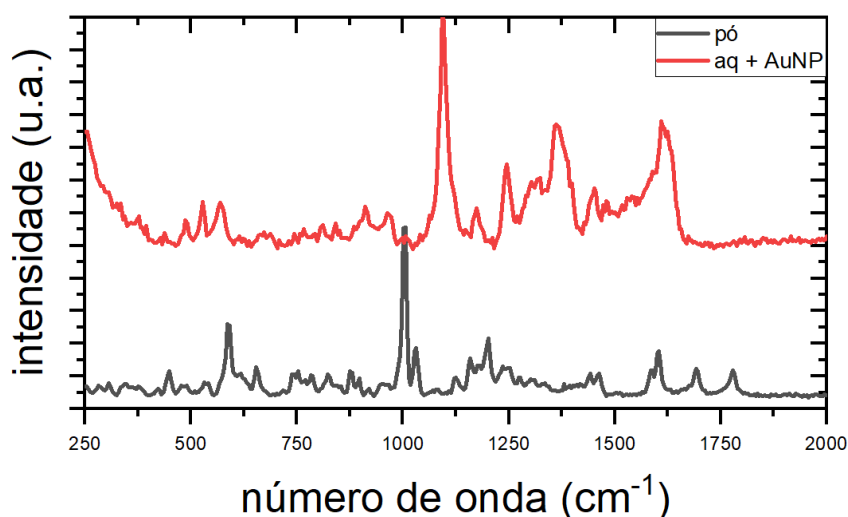
No espectro Raman é muito característico os três picos intensos ao final do gráfico, sendo o primeiro deles, conforme discutido na seção anterior, devido também ao anel benzênico (1600 cm^{-1}) e os outros dois a vibrações do anel β -lactâmico (1692 e 1782 cm^{-1}). Um fato interessante, e relevante, é que a medida feita com o antibiótico diluído não apresentou intensificação das duas vibrações associadas ao anel β -lactâmico, apesar de serem perceptíveis sutilmente no espectro resultante. O pico em 1600 cm^{-1} sofreu um deslocamento de $+4\text{ cm}^{-1}$, enquanto o pico associado ao anel tiazolidina sofreu um deslocamento de $+33\text{ cm}^{-1}$. Esses deslocamentos podem ser comparados com os valores obtidos já mencionados na Tabela 5 (pg. 82).

Esta medição não foi a primeira a ser feita, mas serviu de parâmetro para interpretação dos outros resultados. Evidentemente as nanopartículas contribuíram para o aumento do sinal Raman, visto que o tempo de integração em toda área era apenas de $0,5\text{ s}$, e não variava a potência, apresentando uma região (B) onde o *fingerprint* da ampicilina não era obtido, somente sinal ruidoso, e outra região (A) com NP onde o sinal foi encontrado.

O resultado apresentado na Figura 67 foi feito no laboratório CME com espectrômetro Raman Witec (comprimento de onda de excitação é 532 nm , único nesta pesquisa em que o experimento para a ampicilina foi feito neste laboratório). Por ser uma das primeiras medidas feitas, decidiu-se manter uma concentração alta de antibiótico, com a intenção de que seria possível diluí-lo para avaliar a menor concentração possível de se obter um espectro característico. Uma quantidade de $0,1\text{ ml}$ de água era adicionada a 1 mg do

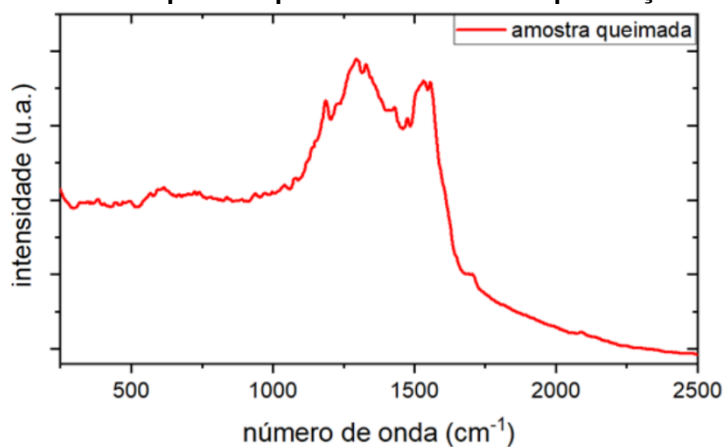
antibiótico. Uma gota de $1 \mu\text{l}$ desta solução era depositada em uma lâmina de vidro juntamente com $1 \mu\text{l}$ do coloide agora de ouro. Durante o experimento, várias medidas foram feitas, e conseqüentemente, na maioria das vezes o espectro não era apresentado. O tempo de integração selecionado foi muito pequeno, pois quando a amostra era interrogada por mais tempo (mais que 10 s) ela queimava localmente com facilidade, o que pode ser visto na Figura 68. Na figura a banda larga presente na região entre aproximadamente 1000 e 1750 cm^{-1} indica a presença de carbono amorfo, pode ser visto como resultado da queima.

Figura 67 - Medida SERS (laser em 10 mW, tempo de integração de 0,1 s) da ampicilina na concentração de 26,9 mM



Fonte: o autor (2023)

Figura 68 - Amostra de ampicilina queimada indicando a presença de carbono amorfo



Fonte: o autor (2023)

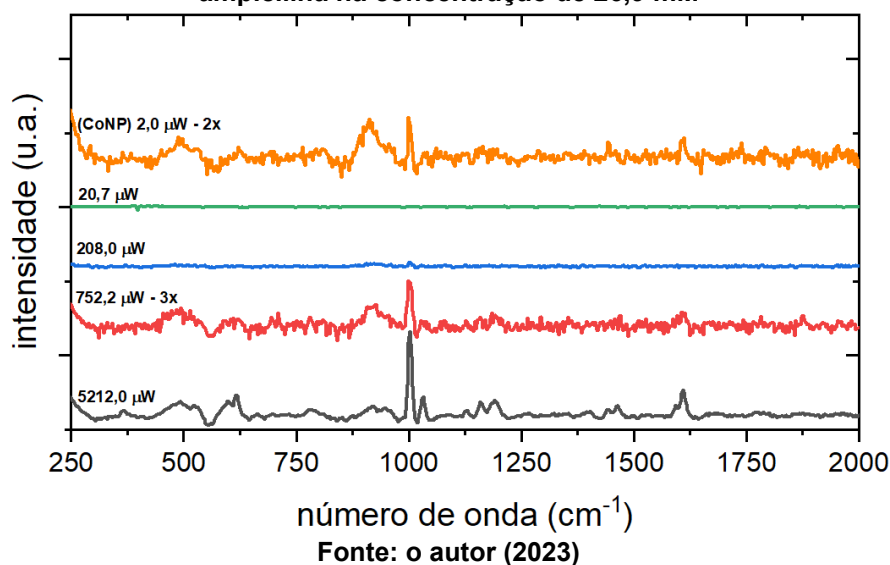
O primeiro resultado relevante desta medida é que mesmo para um tempo de integração muito pequeno, ao ser adicionada nanopartícula de ouro, o espectro característico da ampicilina era obtido, o que leva a crer que de fato isto é uma medida SERS. Outro fato interessante é que nesta medição os dois picos relacionados com o anel β -lactâmico (1692 e 1782 cm^{-1}) não ficaram evidentes. Algo que possa justificar isto é que esta medida, diferentemente da primeira apresentada, não foi obtida através de um mapa que varria uma área da amostra, mas sim com medidas pontuais exploratórias em regiões diferentes da amostra. Talvez se o tempo de integração fosse maior ambos os picos seriam resolvidos, em contrapartida, com maior tempo de integração a amostra era queimada localmente. Importante ressaltar que amostras biológicas, bem como os medicamentos utilizados nesta pesquisa, apresentam fragilidade, por isso os parâmetros como potência do laser de excitação, e até mesmo NPs utilizadas podem contribuir para que a amostra seja degradada rapidamente no momento da interrogação.

Como explicitado na Figura 67 o espectro sofreu um deslocamento geral. A banda mais intensa sofreu um *shift* de $+94\text{ cm}^{-1}$, a de 1201 cm^{-1} foi deslocada com $+164\text{ cm}^{-1}$, e a vibração em 1600 cm^{-1} apresentou-se em 1613 cm^{-1} . Há duas possibilidades: ou o equipamento estava descalibrado, ou a interação da nanopartícula com a amostra faz com que certas vibrações sejam deslocadas algumas frequências. Devido a pouca quantidade de amostra, e tempo de uso de laboratório, não foi possível fazer mais diluições e mostrar o poder do efeito SERS nesta ocasião.

As demais medidas para a ampicilina aqui registradas foram feitas no laboratório FabNS, utilizando um espectrômetro Raman Andor Shamrock SR com objetiva a óleo e com laser de excitação 633 nm (explicitado no capítulo 3) com diferentes metodologias.

Com a mesma concentração de ampicilina, uma amostra do antibiótico ($5\ \mu\text{l}$) foi depositada numa lâmina de vidro e interrogada com diferentes potências, como explicitado na Figura 69.

Figura 69 - Medida SERS (laser com potências variadas, tempo de integração de 10 s) da ampicilina na concentração de 26,9 mM



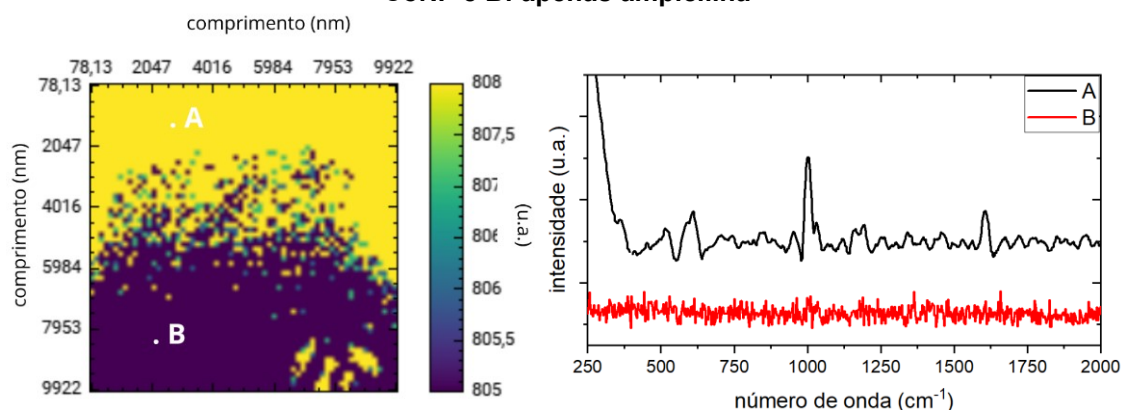
Observou-se que com uma potência alta do equipamento ($5212,0 \mu W$), a amostra diluída ainda assim revelava seu espectro característico (principais bandas evidenciadas: 618 , 1002 , 1192 e 1608 cm^{-1}). Ao diminuir a potência do laser aproximadamente sete vezes ($20,7 \mu W$), a banda mais intensa é perceptível (1002 cm^{-1}) e com menos intensidade a vibração em 1608 cm^{-1} . Quando a potência do laser de bombeamento diminui mais ainda, o espectro some.

Então, numa lâmina de vidro foi depositado $5 \mu l$ do coloide de nanopartículas de cobalto e deixado secar. A lâmina era apoiada sobre um ímã, então as nanopartículas do Co (que são magnéticas) ficavam distribuídas mais uniformemente na superfície da lâmina. Após esta etapa, sobre a gota seca foi depositado $5 \mu l$ de ATB. A intensidade do laser foi diminuída para $2 \mu W$ de potência, e a vibração em 1002 cm^{-1} foi amplificada. Outras bandas também são perceptíveis, como a de 912 e 1608 cm^{-1} .

Este resultado é importante pois demonstra a contribuição do coloide de Co para o efeito SERS, afinal, apesar da potência ter sido diminuída mais de 2000 vezes ainda assim foi possível verificar os picos característicos da ampicilina. Outro fato relevante é que foi usada uma nanopartícula (Co) para além das convencionais em experimentos SERS (Ag e Au).

Devido a este resultado, um novo teste com nanopartículas de cobalto foi realizado. Agora a amostra da ampicilina seria diluída até chegar numa concentração próxima a 5 mM . Então $5 \mu\text{l}$ da amostra foi depositada em cima da gota seca (novamente com a lâmina de vidro sobre um imã) de nanopartícula de Co. Um mapa foi gerado, durante aproximadamente 50 minutos, a partir de medições seriadas feita em cima de uma região de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (64 pontos), apresentado na Figura 70.

Figura 70 - Medida SERS (laser em $752,2 \mu\text{W}$, tempo de integração de $0,5 \text{ s}$) da ampicilina na concentração de $5,4 \text{ mM}$. Mapa e os espectros para os pontos A: ampicilina com CoNP e B: apenas ampicilina



Fonte: o autor (2023)

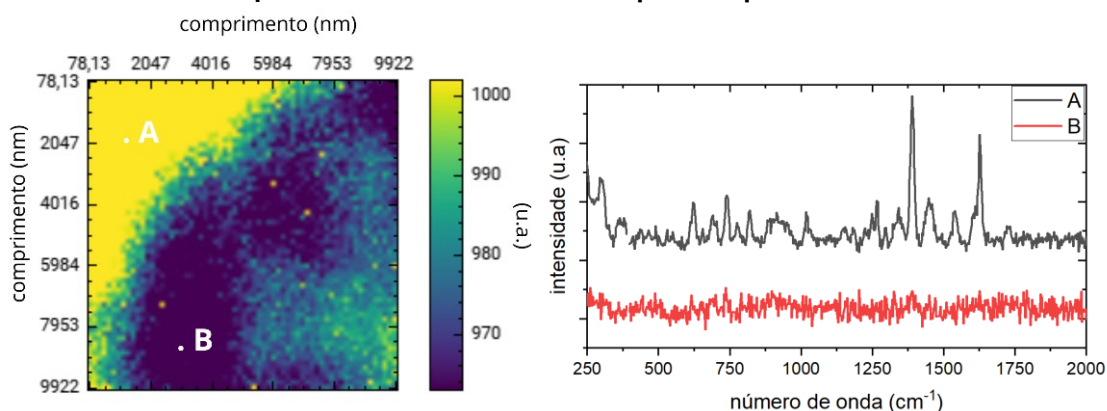
O espectro da ampicilina só foi encontrado na região em amarelo (A) do mapa. Para isso, foi selecionado no software o pico mais intenso, e com ele o mapa foi tratado. Quinze espectros desta região foram selecionados, e feita uma média para obter o gráfico da Figura 70. Na região em azul do mapa (B) não foi encontrado o espectro característico deste antibiótico, pois trata-se de uma região sem nanopartículas. A seleção da região (intersecção das gotas do ATB e da NP) a ser medida na amostra era auxiliada com um microscópio ótico.

Algumas bandas são evidenciadas nesta medida: a banda mais intensa em 1004 cm^{-1} , outra em 611 cm^{-1} (medida no pó em 586 cm^{-1}), 1191 cm^{-1} (medida no pó em 1198 cm^{-1}), e outra em 1605 cm^{-1} (medida no pó em 1600 cm^{-1}). Estes deslocamentos podem ser devido à interação do coloide com o antibiótico, para uma análise mais completa, um estudo feito a partir de simulações e assinalamento de bandas é necessário. De fato, a presença da

nanopartícula aqui auxiliou no aumento de sinal Raman, e novamente usando uma nanopartícula de um metal não convencional.

As medidas com o antibiótico ciprofloxacino aqui apresentadas foram realizadas no laboratório FabNS. A preparação do antibiótico era feita com 1 mg do fármaco para 0,5 ml de água pura. Então 5 μ l da amostra foram depositados em cima da gota seca (novamente com a lâmina de vidro) de nanopartículas de Cu. Um mapa foi gerado (ilustrado na Figura 71) a partir de medições seriadas feita em cima de uma região de 10 μ m \times 10 μ m (64 pontos), sendo executado durante aproximadamente 50 minutos.

Figura 71 - Medida SERS (laser em 20,5 mW, tempo de integração de 0,5 s) do ciprofloxacino na concentração de 5,2 mM. Mapa e os espectros para os pontos A: ciprofloxacino com CuNP e B: apenas ciprofloxacino



Fonte: o autor (2023)

O mapa da Figura 71 apresenta regiões onde se encontra ou não o espectro característico do ATB. A banda selecionada em 1389 cm^{-1} foi escolhida como parâmetro de seleção, então a análise foi feita nas regiões A e B. Apesar da região B apresentar pontos na cor amarela (lado direito do mapa), não foi encontrada a assinatura do antibiótico nesta região. Então, 15 espectros de pontos circundantes na região A foram selecionados para a construção do gráfico apresentado na Figura 71.

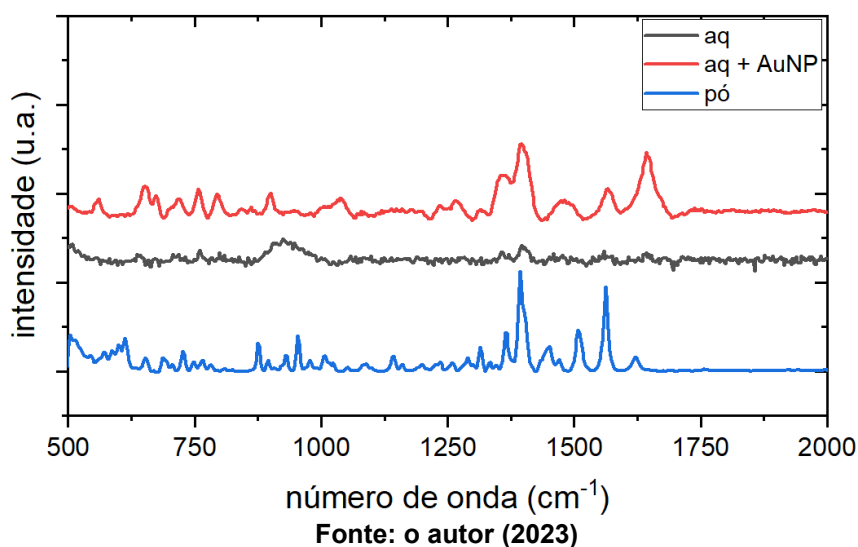
Sobre o deslocamento de picos, notou-se que o pico intenso referente às vibrações do grupo COO, acopladas ao anel piperazinil sofreu um deslocamento de $-4 cm^{-1}$ (em pó medido em 1392 cm^{-1}). As vibrações associadas também ao anel sofreram alguns deslocamentos, como encontradas agora em 1447 cm^{-1}

(no pó em 1464 cm^{-1}), e 1342 cm^{-1} (medida no pó em 1348 cm^{-1}). A banda intensa causada pelos alongamentos do tipo C=C, anteriormente medidas em 1628 cm^{-1} , sofreram um deslocamento de -2 cm^{-1} .

As medidas apresentas na sequência utilizaram-se outras metodologias, e medições singulares de cada amostra (não foram feitos mapas). Procurou-se então variar a potência, a nanopartícula, ou até mesmo a concentração de analitos para fazer interrogações.

Continuando com o analito de ciprofloxacino, desta vez a nanopartícula adicionada foi a de ouro. Como registrado na Figura 72, a amostra diluída em água não apresenta assinatura característica da molécula, quando comparada com amostra em pó, apesar de um leve sinal da banda em 1392 cm^{-1} .

Figura 72 - Medida SERS (laser em $752,2\text{ }\mu\text{W}$, tempo de integração de 15 s) do ciprofloxacino na concentração de 5,2 mM com AuNP



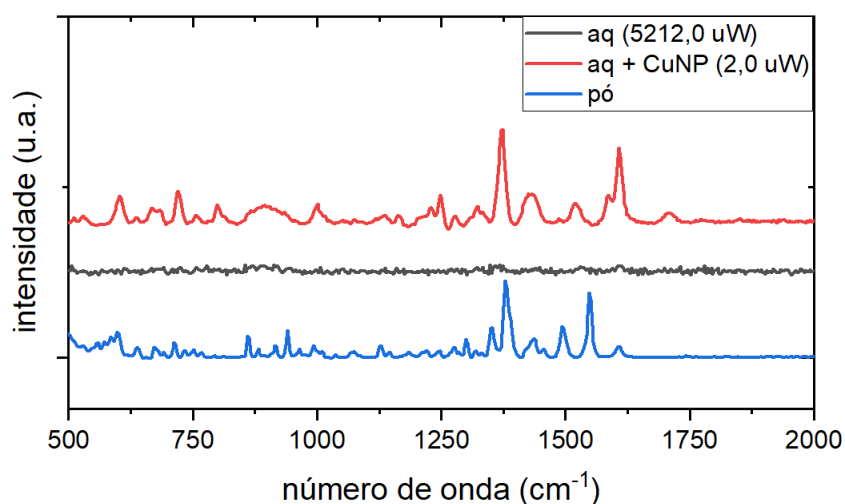
Fica evidente que a amostra, para uma mesma potência (valor relativamente baixo se comparado ao resultado anterior – ATB com cobre na potência de $20,5\text{ mW}$ – na Figura 71), intensifica o sinal ao adicionar nanopartícula de ouro. Nem todos os picos são intensificados, ou apresentam boa distinção.

A banda vibracional apresentada em 1392 cm^{-1} apresentou um *shift* de $+4\text{ cm}^{-1}$, as de 1453 e 1510 cm^{-1} sofreram um deslocamento para 1478 e 1569 cm^{-1} respectivamente. A banda intensa que no pó é medida em 1628 cm^{-1}

apresentou um grande deslocamento ($+14\text{ cm}^{-1}$) agora é apresentada em 1642 cm^{-1} . Isso reafirma o que já foi discutido anteriormente, em conformidade com a Tabela 1, cada ATB deve ser analisado para cada NP usada como coloide. A interação entre eles é diferente, o que resulta em deslocamentos de bandas em regiões distintas.

Ainda com o ciprofloxacino, uma medição singular (medidas em regiões singulares de forma exploratória na amostra, até aparecer espectro característico) foi realizada, para mesma concentração, só que agora usando nanopartícula de cobre. O resultado é apresentado na Figura 73.

Figura 73 - Medida SERS (laser em potências variadas, tempo de integração de 10 s) do ciprofloxacino na concentração de 5,2 mM com CuNP



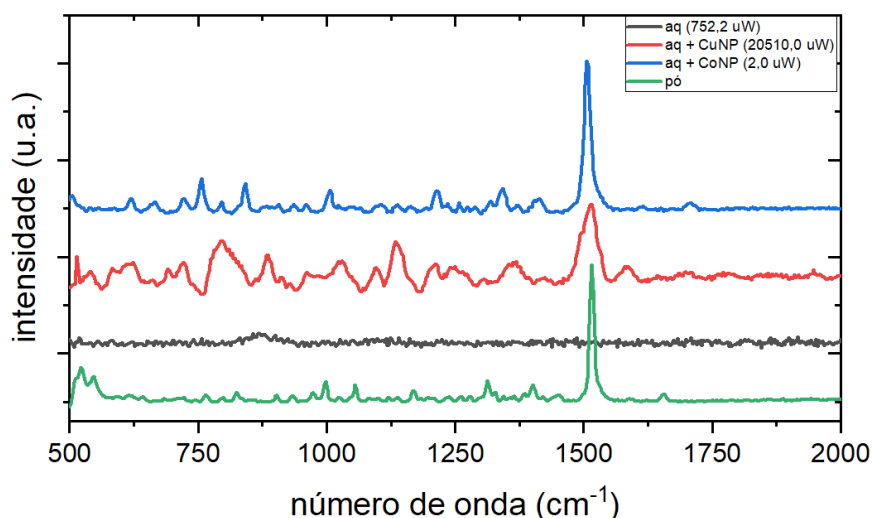
Fonte: o autor (2023)

Claramente, fica observado que a amostra diluída em água não apresenta sinal, mas reduzindo a potência aproximadamente 2600x e adicionando nanopartícula de cobre, o sinal reaparece. Nem todas as vibrações são distinguíveis, mas a NP contribui para o aumento do sinal. Sobre o deslocamento das bandas vibracionais, a primeira mais intensa, antes medida em 1382 cm^{-1} sofreu um deslocamento de -5 cm^{-1} . A vibração em 1464 cm^{-1} sofreu um deslocamento de -27 cm^{-1} , e banda que se apresentava em 1548 cm^{-1} , agora é encontrada em 1522 cm^{-1} . A vibração em 1628 cm^{-1} sofreu um deslocamento de -17 cm^{-1} . Conclui-se que para coloides diferentes, a interação das

nanopartículas com o analito são diferentes, por isto há deslocamento de bandas.

O antibiótico β -lactâmico meropenem também foi testado. Desta vez, 1 mg do ATB foi diluído em 0,5 ml de água pura. Foram testadas duas nanopartículas diferentes para o medicamento. A primeira, uma gota de 5 μ l de CuNP foi depositada sobre uma lâmina de vidro, após a secagem, a mesma quantidade da solução do antibiótico foi depositado sobre a gota. A segunda, uma gota de 5 μ l de CoNP foi depositada sobre uma lâmina de vidro, a qual estava sobre um imã, de forma a obter um substrato mais homogêneo, e a seguir a mesma quantidade de ATB foi colocada sobre esta gota após a secagem. Neste experimento os sinais Raman foram medidos de forma exploratória em regiões diferente da amostra. A Figura 74 ilustra aqueles pontos em que havia encontrado sinal:

Figura 74 - Medida SERS do meropenem na concentração de 4,6 mM com CuNP (tempo de integração de 15 s) e CoNP (tempo de integração de 0,1 s)



Fonte: o autor (2023)

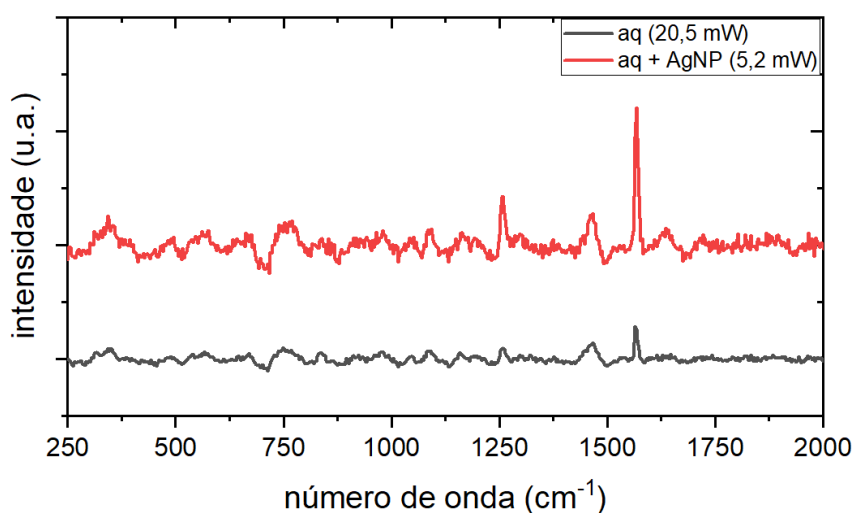
O primeiro resultado mais importante deste experimento foi evidenciar que as nanopartículas contribuíram para a intensificação de sinal, visto que no caso em que não havia NP não se obteve o espectro característico. Começando a análise pela amostra com coloide de Cu, a potência do laser teve que ser elevada para mais alta disponível no equipamento para obtenção do espectro. Em comparação, a nanopartícula de Co se mostrou mais eficiente, pois com uma

potência mais baixa foi possível obter o sinal característico da molécula. O tempo de integração chama bastante atenção, pois utilizou-se um tempo 150x menor para o cobalto. Sugere-se que a CoNP foi mais eficiente neste sentido também, mas para afirmações mais concretas mais testes devem ser feitos.

A banda mais intensa, associada aos anéis β -lactâmico e pirrolidina, em 1556 cm^{-1} sofreu um deslocamento de -10 cm^{-1} para o coloide de Co e -2 cm^{-1} para o coloide de Cu. Visualmente é perceptível que o coloide de cobalto conseguiu intensificar de uma maneira mais eficiente o sinal, se comparado com o de cobre, pois foi apresentado bandas mais estreitas. Infelizmente, para associar as outras bandas com o espectro Raman em pó do meropenem, deve ser feito estudo de assinalamento de bandas e simulações, afirmações concretas só é possível fazer ao pico mais intenso no momento.

Para 1 ml de água, 1 mg de vancomicina foi diluída, chegando na concentração de $6,7\text{ mM}$. Então, uma gota de $5\ \mu\text{l}$ de AgNP foi depositada numa lâmina de vidro, e, após a secagem, $5\ \mu\text{l}$ do ATB diluído era depositado em cima do coloide. De forma exploratória na amostra foi medida seu espectro, e para região em que o sinal Raman característico apareceu, foi feito o gráfico ilustrado na Figura 75:

Figura 75 - Medida SERS (tempo de integração de 10 s) da vancomicina na concentração de 6,7 mM com AgNP



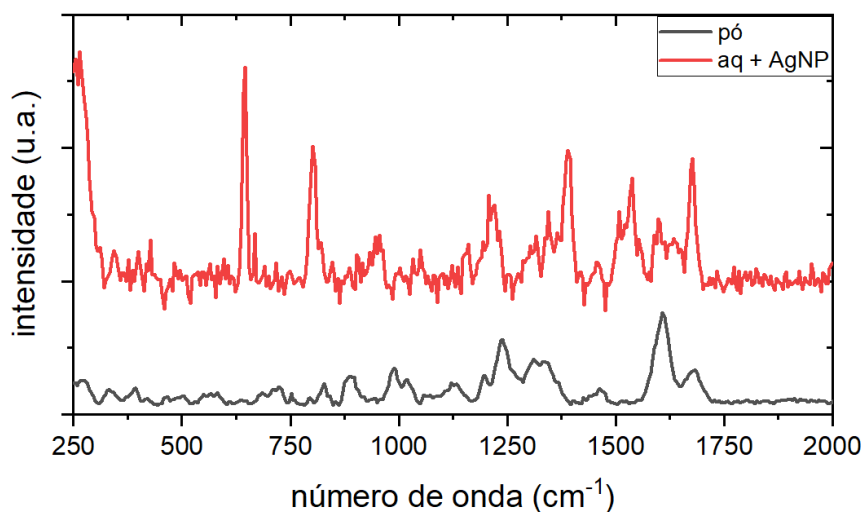
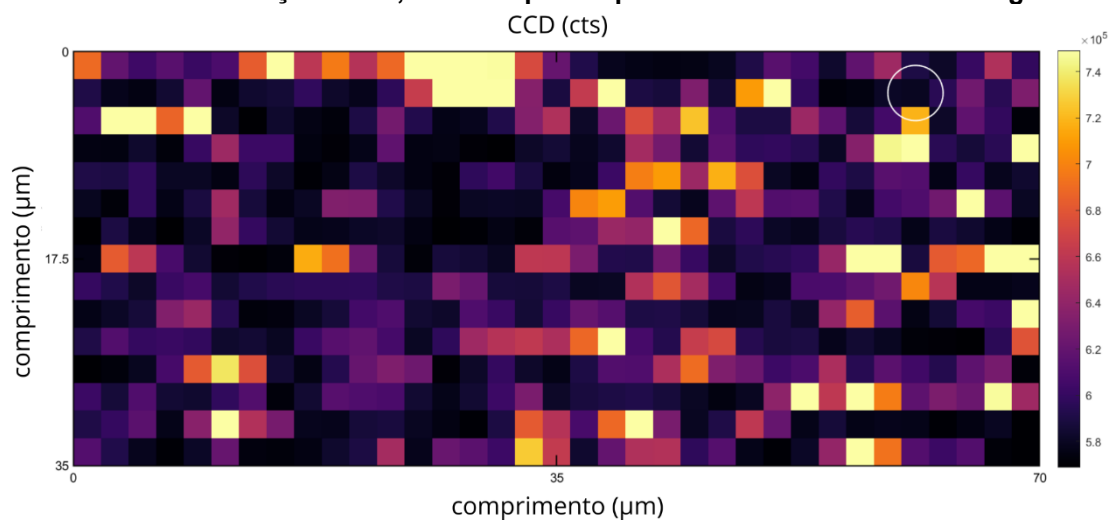
Fonte: o autor (2023)

Apesar de diluída, a amostra, em uma potência de laser de excitação alta, apresentou um sinal característico do antibiótico. Isto pode ser devido ao fato de que a potência tinha um valor alto e que a molécula da vancomicina é uma molécula grande. O pico Raman mais intenso, em 1608 cm^{-1} não sofreu deslocamento. Já o pico encontrado em 1462 cm^{-1} sofreu um deslocamento de $+45\text{ cm}^{-1}$ se comparado a molécula em pó. E o pico em 1299 cm^{-1} foi apresentado em 1238 cm^{-1} no pó. Diferentemente das outras medidas, a esta em particular não há evidência que as nanopartículas causaram deslocamento, pois este mesmo deslocamento aconteceu quando a molécula foi diluída em água.

Outro fato é que os picos em 1462 e 1299 cm^{-1} mostraram uma maior intensificação relativa, se comparado com a banda vibracional em 1507 cm^{-1} . Mas para uma conclusão mais precisa sobre a vancomicina, mais estudos referentes a ela necessitam serem feitos, pois, como já discutido na seção 4.2, não foi encontrado na literatura seu espectro característico.

A medida a seguir, foi feita no CME, utilizando o microscópio Raman confocal *Witec alpha 300R*, com excitação em 532 nm , apresentado na metodologia. Este foi o primeiro mapa feito nesta pesquisa, pois verificou-se que se toma muito tempo para fazer medições em regiões da amostra de forma exploratória com medidas singular. Logo, poderia ser mais proveitoso se uma região pequena da amostra ($70\text{ }\mu\text{m} \times 35\text{ }\mu\text{m}$) fosse analisada de maneira sequencial. Então, 1 mg de vancomicina foi diluída em $0,01\text{ ml}$ de água pura, resultando numa concentração de $67,3\text{ mM}$ (este valor alto justifica-se, pois, a intenção era analisar qual a concentração mínima de ATB que ainda era possível encontrar um espectro Raman característico). O resultado apresenta-se na Figura 76:

Figura 76 - Medida SERS (laser em 10 mW, tempo de integração de 0,1 s) da vancomicina na concentração de 67,3 mM. Mapa e espectros da vancomicina com AgNP

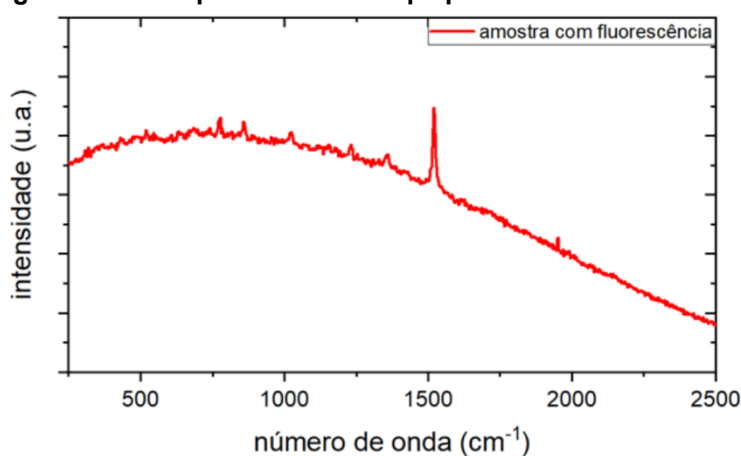


Fonte: o autor (2023)

Nos pontos onde no mapa se apresentam de uma coloração mais escura (roxo) não era encontrado sinal algum, apenas ruído. Somente em alguns pontos das regiões em amarelo foi possível encontrar alguma assinatura. Se for levado em consideração que o experimento discutido anteriormente (Figura 75) no qual também se utilizou nanopartícula de prata, o pico encontrado em 1608 cm^{-1} para o pó pode ser encontrado em 1597 cm^{-1} , e o pico a sua direita, relativamente menos intenso, em 1684 cm^{-1} , sofreu uma intensificação maior, e pode ser encontrado agora em 1677 cm^{-1} . Mas, infelizmente mais testes não puderam ser feitos, e afirmações concretas a respeito deste espectro não podem ser feitas. Há necessidade de um estudo sistemático onde a vancomicina é objeto de estudo.

Fica o registro que durante as medições SERS, com os coloides de Au e Ag as amostras apresentavam mais fluorescência (exemplificado na Figura 77), não o suficiente para encobrir o espectro, mas que podia ser contornada com a subtração da linha de base do espectro “bruto”. Estes mesmos coloides, em muitos casos queimavam as amostras. Em comparação, as nanopartículas de vanádio e cobalto apresentaram um comportamento tal que com elas os espectros foram obtidos mais facilmente, principalmente as de vanádio.

Figura 77 - meropenem com AuNp apresentando fluorescência



Fonte: o autor (2023)

4.4 Resultados finais

Ressalta-se que esta pesquisa tem caráter qualitativo, e não quantitativo. Por isso não foram medidos fatores de intensificação de sinal Raman, tão pouco concentração de amostras e limite de detecção do sinal. A Tabela 7 resume os resultados obtidos na pesquisa. Para todos os antibióticos foram obtidos espectros vibracionais para quatro comprimentos de onda diferentes, e obtido a intensificação do sinal Raman (efeito SERS) com nanopartículas diferentes dependendo do antibiótico.

Tabela 7 - Resultados

Antibiótico	Raman (nm)	SERS
Ampicilina		Au, Co, V
Ceftazidima		n.d.
Meropenem		Co, Cu
Gentamicina	532, 633,	n.d.
Polimixina B	785, 1064	n.d.
Ciprofloxacino		Au, Cu
Vancomicina		Ag

Fonte: o autor (2023)

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi demonstrado que através dos alvos selecionados, nanopartículas de Au, Ag, Cu, Co e Fe foram sintetizadas e possuem propriedades plasmônicas, logo, podem ser utilizadas como intermediadoras do efeito de aumento plasmônico (criação de *hotspots*), base do efeito SERS.

Quanto à avaliação própria da síntese de nanopartículas, resultados mostraram que o coloide derivado da ablação usando os dois comprimentos de onda podem não ter apresentado nanopartículas com menores tamanhos (menores que 10 nm), mas pela medição do UV-Vis, fica evidente que há uma concentração maior de quantidade de nanopartículas produzidas com os dois harmônicos do laser, o que indica uma maior taxa de produção de nanopartículas.

Ao ser comparado a contribuição particular de cada harmônico, resultados mostraram estarem de acordo com a literatura, pois o laser operando em 532 nm apresentou uma produção de nanopartículas menores que ao laser operando no IR. Há dependência também do comprimento de onda com a taxa de produção de nanopartículas, mas para este caso ser afirmado com mais precisão, a produção das nanopartículas com os comprimentos de onda individuais do laser deveriam ser feitos com a mesma energia, o que não foi possível realizar no momento por limitações do equipamento disponível. Há necessidade de trabalhos mais sistemáticos e com mais controles sobre as variáveis para de fato apresentar algo concreto. Como LASiS não era o foco principal desta dissertação (apesar de ter grande relevância), os resultados obtidos a partir de então são de caráter preliminar.

As propriedades das nanopartículas, sejam de caráter morfológico ou quanto à carga e ressonância plasmônica foram possíveis de serem comparadas através das técnicas de caracterização (DLS, UV-Vis, TEM, potencial zeta). Infelizmente, nesta pesquisa o equipamento AFM apresentou uma limitação de detecção, o que não permitiu comparações com as outras técnicas aqui citadas.

O uso da espectroscopia Raman apresentou grande potencial na avaliação da detecção e caracterização dos antibióticos selecionados. Notou-se uma

lacuna que não foi possível de ser preenchida com esta pesquisa - pois não era seu objetivo - que é o assinalamento de bandas vibracionais dos espectros dos ATBs. Tal abordagem de análise mostra o benefício de ser feita de forma rápida e sem a geração de resíduos na amostra, o que pode contribuir com outras áreas científicas para aplicação em diagnóstico e monitoramento de drogas, em especial na saúde.

Apesar de todos os sete antibióticos terem seus espectros Raman medidos com quatro comprimentos de onda diferentes, o experimento da diluição deles em água para combinação com os coloides e obtenção da intensificação Raman (SERS) não foi possível com todos. Isto justifica-se devido a algumas limitações: a quantidade de amostras de fármacos disponível era pequena, devido ao preço de cada antibiótico; alguns medicamentos em pó apresentavam certa aderência, o que dificultava seu manuseio, e parte da amostra era perdida; o acesso ao espectrômetro foi limitado, obteve-se pouco tempo de equipamento. Como medidas SERS dependem de algumas variáveis, não houve tempo hábil para testar todas as amostras em vários cenários possíveis (variando tempo de integração, variando potência do laser, variando concentração da amostra, variando nanopartículas utilizadas).

O objetivo principal deste trabalho foi alcançado, sendo a obtenção do espectro SERS dos antibióticos selecionados. Apesar das dificuldades, importantes resultados foram obtidos. Pelo resumo apresentado na Tabela 7, esta pesquisa demonstrou que a espectroscopia SERS pode ser intermediada por nanopartículas para além das convencionais (ouro e prata), e em conformidade com a Tabela 1, o método deve ser otimizado para cada amostra.

Esta pesquisa desenvolvida e apresentada nesta dissertação contribuirá para aplicação da espectroscopia Raman/SERS, como alternativa diagnóstica, no monitoramento de drogas que é uma importante ação para o combate à resistência antimicrobiana.

5.1 Trabalhos futuros

Depois de realizar uma pesquisa extensa, muitas vezes é necessário identificar quais trabalhos futuros precisam ser realizados para expandir o

conhecimento e aprofundar a compreensão do assunto estudado. Esses trabalhos futuros podem ser necessários para preencher lacunas na pesquisa existente, testar novas hipóteses, explorar outras perspectivas ou ampliar a amostra de participantes, contribuindo para o avanço da área de estudo e fornecer benefícios práticos e relevantes.

Sobre a relevância da síntese de nanopartículas produzidas com ablação a laser usando dois comprimentos de onda ao mesmo tempo, há a necessidade de ser mais explorado para compreender a eficiência dos substratos.

Um trabalho importantíssimo a ser realizado é a criação de um banco de dados dos espectros Raman desses antibióticos, e outros fármacos (envolvendo assinalamento de bandas, reconhecimento de espectros e afinidade de nanopartículas), para que de fato esta tecnologia possa ser usada a larga escala por profissionais que não são somente específicos da área de ciências dos materiais, mas da saúde e outras áreas de interesse. Sendo assim, um protocolo diagnóstico para a detecção qualitativa e, enfaticamente, quantitativa de antibióticos é avaliado como importante pois pode vir a ser uma alternativa para os métodos atuais que possuem alta complexibilidade de execução, longo tempo à espera de resultados e tem alto custo.

5.2 Trabalhos publicados

Devido às frentes de pesquisa e colaborações em que o grupo Fotonanobio está inserido, ao longo da pesquisa contribuições foram feitas e alguns trabalhos foram elaborados conforme registro a seguir.

TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS:

- 1- ANJOS, V. P.; MARANGONI, C. G.; THALER, J; MACHADO, T. N.; COSTA, L. M.; SCHREINER, W. H.; GOES, R. E.; BEZERRA JR, A. G. Detection and characterization of antimicrobials by Raman/SERS Spectroscopy. In: **XX Brazil MRS Meeting - SBPMat**, 2022, Foz do Iguaçu. Anais do SBPMat 2022, 2022.
- 2- MARANGONI, C. G. P. S.; MACHADO, T. N.; THALER, J.; ANJOS, Vinicius P.; DALLA-COSTA, L. M.; GOES, R. E.; SCHREINER, W. H.; BARROS, F.

S; BEZERRA JR, A. G. Detecção e caracterização de antimicrobianos usando espectroscopia Raman amplificada por superfície. In: **XXVII Congresso Brasileiro de Infectologia**, 2021, Goiânia. Anais do Congresso Brasileiro de Infectologia 2021, 2021.

RESUMOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS:

- 1- Marangoni, CGPS; Machado, TN; Thaler, J; Anjos, VP; Barros, FS; Costa, LMD; De Goes, RE; Schreiner, WH; Bezerra-Jr, AG. Detecção e caracterização de antimicrobianos utilizando a espectroscopia Raman Amplificada por superfície. In: **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 2022; 26(S1):101996 <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101999>

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. Q. D. **AFM condutivo (CAFEM):** aplicação em dispositivos semicondutores. 2018. Tese (Doutorado em Física) – Curso de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- AMENDOLA, V. MENEGHETTI, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 20, 2009. p. 3805-3821, 2009.
- AMINOV, R. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers in Microbiology**, [S. L.], v. 1, n. 08, p. 1-7, dez. 2010.
- ANDREOU, C., *et al.* Detection of low concentrations of ampicillin in milk. **Analyst**, [S. L.], v. 140, n. 15, p. 5003-5005, jun. 2015.
- ARAÚJO, L. de L. C.; AZEVEDO, F. H. C. Study of the beta-lactamase enzyme and its relationship with antibiotic resistance. **Research, Society and Development**, [S. L.], v. 9, n. 7, p. e663974594, jun. 2020.
- AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos**. 2014. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa. Porto. 2014.
- BAIA, Monica; ASTILEAN, Simion; ILIESCU, Traian. **Raman and SERS Investigations of Pharmaceuticals**. [S.I.]: Springer, 2008.
- BARCIKOWSKI, S. *et al.* **Handbook of Laser Synthesis of Colloids**. 150 p. Alemanha: DueEPublico, 2016.
- BELLOSO, W. H. Historia de los antibióticos. **Revista del Hospital Italiano de Buenos Aires**, Buenos Aires, v. 29, n. 2, p. 102-111, dez. 2009.
- BEZERRA, A. Jr., *et al.* Plasmonics and SERS activity of post-transition metal nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**. [S. L.], v. 20, n. [s. n.], mai. 2018.
- BEZERRA, A. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering using bismuth nanoparticles: a study with amino acids. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. L.], v. 19, n. 362, [s. n.], nov. 2017.

BURAKOV, V.S. *et al.* Formation of Nanoparticles During Double-pulse Laser Ablation of Metals in Liquids. **The European Physical Journal**, [S. L.], v. 30, n. 2, p. 107-112, mai. 2005.

CAILLETAUD, J *et al.* Critical review of surface-enhanced Raman spectroscopy applications in the pharmaceutical field. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Science Direct, v. 147, n. 5, p. 458-472, jan. 2018.

CALIXTO, Carolina Maria Fioramonti; CAVALHEIRO, Éder Tadeu Gomes. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico. **Química Nova na escola**, [S. L.], v. 34, n. 3, p. 118-123, 2012. 118-123.

CDTN. A utilização de aptâmeros radiomarcados no diagnóstico específico de infecções pós-cirúrgicas. **Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear**, mai. 2018. Disponível em: <https://antigo.cdtm.br/ultimas-noticias/121/newsletter/301-a-utilizacao-de-aptameros-radiomarcados-no-diagnostico-especifico-de-infecoes-pos-cirurgicas>. Acesso em: 31 maio 2023.

CIELECKA-PIONTEK, J. *et al.* Solid-state stability study of meropenem – solutions based on spectrophotometric analysis. **Chemistry Central Journal**, [S. L.], v. 7, n. 98, p. 1-9, jun. 2013.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S. L.], v. 74, n. 3, p. 417-433, set. 2010.

DELL'AGLIO, M. *et al.* Collinear double pulse laser ablation in water for the production of silver nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S. L.], v. 15, n. 48, p. 20868-20875, out. 2013.

EATON, Peter; WEST, Paul. **Atomic Force Microscopy**. v. 1, 1. ed. Nova York: Oxford University Press, 2010.

FAZIO, E. *et al.* Nanoparticles Engineering by Pulsed Laser Ablation in Liquids: Concepts and Applications. **Nanomaterials**, [S. L.], v. 10, n. 11, p. [s. n.], nov. 2020.

FIGUEREDO, A. C. F. *et al.* Pseudomonas aeruginosa: panorama do perfil de resistência aos carbapenêmicos no Brasil. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 9661-9672, jan. 2021.

FLEMING, Alexander. **On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae**. [S.l.]: [S.n.], 1929.

GELPI, A.; GILBERTSON, A.; TUCKER, J. D. Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology. **Sexually Transmitted Infections**. [S. L.], v. 91, n. 1, p. 69-69, fev. 2015.

HAUGSTAD, Greg. **Atomic Force Microscopy: Understanding Basic Modes and Advanced Applications**. v. 1, 1. ed. Nova Jersey: Wiley, 2012.

HIDI, I. J. *et al.* Ciprofloxacin: pH-dependent SERS signal and its detection in spiked river water using LoC-SERS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. [S. L.], v. 408, n. 29, p. 8393–8401, out. 2016.

HOFER, U. The cost of antimicrobial resistance. **Nature Reviews Microbiology**. [S. L.], v.17, n. 3, p. [s. n.], jan. 2019.

HORCAS, I. *et al.* WSxM 4.0. **Review of Scientific Instrumentrs**. [S. L.], v. 78, n. 013705, jan. 2007.

HOSSEINI, K *et al.* Non-Invasive Monitoring of Commonly Used Intraocular Drugs Against Endophthamists by Raman Spectroscopy. **Lasers in Surgery and Medicine**, [S. L.], v. 32, n. 4, p. 265-270, abr. 2003

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, n. [s. n.], p. 72-80, out. 2019.

ISRAELSEN, N.; HANSON, C.; VARHIS, E. Nanoparticle Properties and Synthesis Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Factor: An Introduction. **The Scientific World Journal**. [S. L.], vol. 15, n. [s. n.], mar. 2015.

JAWORSKA, A. *et al.* Potential of Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) in Therapeutic Drug Monitoring (TDM). A Critical Review. **Biosensors**, v. 6, n. 3, p. 1-17, set. 2016.

KIM, J. *et al.* The influence of laser wavelength and fluence on palladium nanoparticles produced by pulsed laser ablation in deionized water. **Solid State Sciences**. [S. L.], v. 37, n. [s. n.], p. 96-102, nov. 2014.

KNEIPP, K.; KNEIPP, H.; MOSKOVITS, M. **Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications**. Berlin: Springer, 2006.

KUMAR, A.; DIXIT, C. K. **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017.

LEONARD, H. *et al.* Recent Advances in the Race to Design a Rapid Diagnostic Test for Antimicrobial Resistance. **ACS Sensors**. [S. L.], v. 3, n. 11, p. 2202-2217, out. 2018.

LI, M.; *et al.* Heterostructured cube Au–Ag composites for rapid Raman detection of antibiotic ciprofloxacin. **Journal of Raman Spectroscopy**. [S. L.], v. 48, n. 4, p. 525-529, dez. 2016.

LI, S. F. Y.; WU, Y. S. Electrophoresis - Capillary Electrophoresis. **Encyclopedia of Separation Science**. [S. L.], v. 2000, n. [s. n.], dez. 2003.

LIN, Ping-C. *et al.* Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 711-726, ago. 2014.

MACHADO, O.; *et al.* **Antimicrobianos**: revisão geral para graduandos e generalistas Revisão. p. 455. Fortaleza: EdUnichristus, v. 1, 2019.

MACHADO, T. *et al.* Plasmonics and SERS activity: beyond gold and silver. In: SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2019, São Paulo. **Anais do SBFoton IOPC**, 2019.

MACHADO, T. N. **Síntese, Caracterização e Investigação da Atividade SERS de Nanopartículas de Metais não Convencionais**. 2005. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**. [S. L.], v. 18, n. 3, p. 268-281, mai. 2011.

MAIER, S. A. **Plasmonics: Fundamentals and Applications**. 223 p. [S.l.]: Springer, 2007.

MAJUMDER, Md A. A. *et al.* Antimicrobial Stewardship: Fighting Antimicrobial Resistance and Protecting Global Public Health. **Infection and Drug Resistance**. [S. L.], v. 13, n. [s. n.], p. 4713-4738, dez. 2020.

MARANGONI, C. G. **Antimicrobial Stewardship**: uma contribuição baseada na espectroscopia raman amplificada por superfície - sers. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

MEJÍA-SALAZAR, J. NEW Trends in Plasmonic (bio)sensing. In: Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 90, n. 1. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2018.

MITSUTAKE, H.; POPPI, R.; BREITKREITZ, M. Raman Imaging Spectroscopy: History, Fundamentals and Current Scenario of the Technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. [S. L.], v. 30, n. 11, p. 2243-2258, nov. 2019.

MUHAMMAD, M.; HUANG, Q. A review of aptamer-based SERS biosensors: Design strategies and applications. **Talanta**. [S. L.], v. 227, n. 1222188, p. [s. n.], mai. 2021.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**. [S. L.], v. [s. n.], n. [s. n.], p. 1-24, mai. 2015.

NADAS, Rafael B. *et al.* Synthesis and Optical Characterization of Terfenol-D Nanoparticles. 2018 **Sbfoton International Optics And Photonics Conference (sbfoton lopc)**, [s.l.], p.1-4, out. 2018. IEEE. <http://dx.doi.org/10.1109/sbfotoniopc.2018.8610885>.

NADAS, R. B. **Produção e Caracterização de Nanopartículas de Terfenol-D**. 2019. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

NEIVA, Luciana B. D. M. *et al.* Polimixina B: efeito dose e tempo dependente na nefrotoxicidade in vitro. **Acta Paulista de Enfermagem**. São Paulo, v. 26, n. 1, p. 57-62, 2013.

NUSSENZVEIG, H. Moisés. **Curso de Física Básica**: ótica, relatividade, física quântica. v. 4, 1. ed. São Paulo: Blucher, 1998.

PICOLLO, M.; ACETO, M.; VITORINO, T. UV-Vis spectroscopy. **Physical Sciences Reviews**. [S. L.], v. 4, n. 4, p. [s.n], abr. 2018.

PLAUTZ, G. L. **Caracterização Óptica e Estrutural de Pontos Quânticos de Silício Obtidos por Ablação a Laser em Água**. 2016. Dissertação (Mestrado em Física) - Programa de Pós-Graduação em Física do Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná., Curitiba. 2015.

QI, H., *et al.* Quantitative analysis of ceftazidime using SERS based on silver nanoparticles substrate. **Proceedings of spie**. [S. L.], v. 10823, n. [s. n.], out. 2018.

RAZA, Hassan. **Freshman Lectures on Nanotechnology**. Islamabad: Springer, 2019.

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

SANTOS, J. F. L. *et al.* Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Aplicação em Biossensores e Células Solares. **Química Nova**. [S. L.], v. 39, n. 9, nov. 2016.

SANTOS, R. **Síntese Física e Caracterização de Pontos Quânticos de Tungstênio**. 2022. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

SCHRADER, Bernhard. **Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications**. Weinheim: VHC, 1995.

SMITH, Ewen; DENT, Geoffrey. **Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach**. Inglaterra: John Wiley & Sons, 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. [S. L.] v. 33, n. 3, p. 281-301, jun. 2000.

THALER, Juliana *et al.* SERS activity of Co, Ni and Bi nanoparticles. 2018 **Sbfoton International Optics And Photonics Conference (sbfoton iopc)**, [s.l.], p.1-4, out. 2018. IEEE. <http://dx.doi.org/10.1109/sbfoton-iopc.2018.8610936>.

THALER, J. **Espectroscopia Raman Amplificada Por Superfície Com Nanopartículas De Ni, Co E Bi Para Detecção De Biomoléculas E Microrganismos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

THORNTON, Stephen T.; REX, Andrew. **Modern Physics for Scientists and Engineers**. 3. ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2006.

TORRISI, L. *et al.* Pulsed laser ablation of gold at 1064 nm and 532 nm. **Czechoslovak Journal of Physics**. [S. L.], v. 54, n. 3, p. 421-430, mar. 2004.

WNAG, K. *et al.* Detection and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Nanomaterials**. [S. L.], v. 8, n. 10, p. 792-, set. 2019.

ZALESKI, S. *et al.* Identification and Quantification of Intravenous Therapy Drugs Using Normal Raman Spectroscopy and Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**. [S. L.], v. 4, n. 89, p. 2497-2504, jan. 2017.

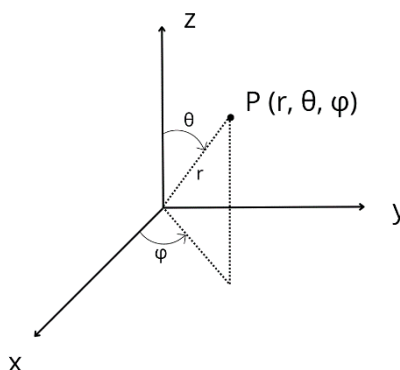
ZMBERLAN, A. O. **SISTEMA MULTIAGENTE PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE AGLOMERAÇÃO**. 2018. Tese (Doutorado em Nanociências) – Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Universidade Franciscana, Santa Maria, 2018.

APÊNDICE 1 – Ressonância de plásmon de superfície: extinção

Da teoria eletromagnética, podemos encontrar a solução do potencial elétrico em coordenadas esféricas da equação de Laplace:

$$\nabla^2 V = 0$$

Figura 78 - Coordenadas polares



Fonte: o autor (2023)

Partindo da equação geral do laplaciano em coordenadas esféricas (Figura 78):

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial V}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial V}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 V}{\partial \varphi^2} = 0$$

O problema em questão tem simetria azimutal, logo não V não tem dependência de φ , conseqüentemente, o último termo do laplaciano é igual a zero:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial V}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial V}{\partial \theta} \right) = 0$$

Reescrevemos o potencial como função de r e θ , para encontrar uma solução a partir do método de separação de variáveis:

$$V(r, \theta) = R(r)\Theta(\theta)$$

Substituindo na equação do laplaciano, temos que:

$$\Theta \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial R}{\partial r} \right) + \frac{R}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial \Theta}{\partial \theta} \right) = 0$$

Dividindo a equação por $R\Theta$, chegamos em:

$$\frac{1}{R} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial R}{\partial r} \right) + \frac{1}{\Theta \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial \Theta}{\partial \theta} \right) = 0$$

Separando as variáveis, toma-se:

$$\frac{1}{R} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial R}{\partial r} \right) = c_1$$

$$\frac{1}{\Theta \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial \Theta}{\partial \theta} \right) = c_2$$

De forma que $c_1 + c_2 = 0$.

Substituindo a constante c_1 por uma constante já determinada pela matemática $l(l+1)$:

$$\frac{1}{R} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial R}{\partial r} \right) = l(l+1)$$

Rearranjando os termos, e considerando que a equação só depende de r , tomamos a derivada parcial por total:

$$\frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dR}{dr} \right) = l(l+1)R$$

A qual tem solução do tipo:

$$R(r) = Ar^l + \frac{B}{r^{l+1}}$$

Como $c_2 = -c_1$ e tomando a derivada total novamente, a segunda equação torna-se:

$$\frac{d}{d\theta} \left(\text{sen}\theta \frac{d\Theta}{d\theta} \right) = -l(l+1)\text{sen}\theta\Theta$$

A qual tem solução:

$$\Theta(\theta) = P_l(\cos\theta)$$

Onde P_l são os polinômios de Legendre. Substituindo na equação (), temos como solução:

$$V(r, \theta) = \left(Ar^l + \frac{B}{r^{l+1}} \right) P_l(\cos\theta)$$

Mas como há várias possibilidades de solução para diferentes l , a solução geral é a soma dessas possíveis soluções:

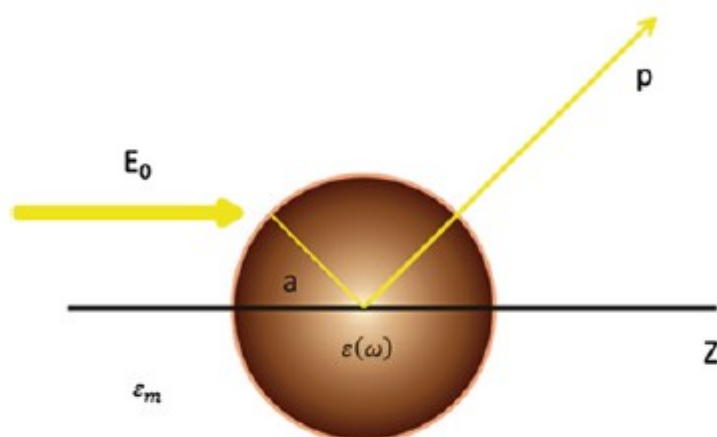
$$V(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} \left(A_l r^l + \frac{B_l}{r^{l+1}} \right) P_l(\cos\theta)$$

Assumindo que as condições de contorno dizem respeito a uma partícula esférica metálica no vácuo (ilustrada na Figura 79), ($r \rightarrow \infty, V_{out} \rightarrow -E_0 r \cos\theta, B_l = 0$ para $l \neq 1$, e definindo $r = a$ com $a \ll \lambda$) obteremos as frequências a partir dos resultados explicitados até aqui:

$$p = \chi E$$

Esta equação mostra que ao incidir o campo elétrico da luz E num material, este material polariza. χ é suscetibilidade do material.

Figura 79 - Polarização



Partícula metálica homogênea em um campo eletrostático.
Fonte: adaptado de MAIER (2007)

$$V_{in}(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} A_l r^l P_l(\cos\theta)$$

$$V_{out}(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} \left(B_l r^l + \frac{C_l}{r^{l+1}} \right) P_l(\cos\theta)$$

A relação de extinção pode ser calculada como a soma da absorção e do espalhamento, onde as constantes ε e ε_m estão associadas ao índice de refração da partícula e do meio respectivamente, ao resolver as equações para este tipo de situação, o resultado, encontrado por Mie, é:

$$C_{esp} = \frac{k^4}{6\pi} |\chi|^2 = \frac{8\pi}{3} k^4 a^6 \left| \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right|^2$$

$$C_{abs} = klm|\chi| = 4\pi k a^3 lm \left| \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right|$$

No limite quase-estático da função dielétrica, tem-se que $\varepsilon = \varepsilon_1 + i\varepsilon_2$. Observa-se que tanto a absorção quanto o espalhamento são aumentados quando há excitação do dipolo. O que leva:

$$C_{ext} = C_{abs} + C_{esp}$$

$$C_{ext} = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^{1,5} V \frac{\varepsilon_2}{(\varepsilon_1 + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_2^2}$$

Quando $\varepsilon_1 = -2\varepsilon_m$, a condição de ressonância é atingida. Um campo elétrico homogêneo, ao incidir sobre a partícula metálica, faz com que haja deslocamento de seus elétrons no sentido contrário ao campo incidente, promovendo a indução de um dipolo elétrico na partícula. O dipolo induzido causa o aparecimento de um campo

elétrico restaurador na partícula, o qual tem a função de restaurar o equilíbrio dado pela distorção das cargas. Esta força restauradora e a indução do dipolo geram a ressonância plasmônica (SANTOS, SANTOS, *et al.*, 2016) (MAIER, 2007).

O padrão de radiação espalhada por uma partícula é dependente do tamanho da partícula, do índice de refração dela e do meio, e do comprimento de onda da radiação incidente. Ou seja, quando o material da partícula sob investigação é alterado, ela também altera a constante dielétrica, alterando assim a resposta óptica daquele material. É o que diferencia os valores da LSPR para Au e Ag, por exemplo.